



**Ana Lúcia Perestrelo
Oliveira**

**Extracção e Caracterização de Constituintes da
Bananeira ‘Dwarf Cavendish’**



**Ana Lúcia Perestrelo
Oliveira**

**Extracção e Caracterização de Constituintes da
Bananeira ‘Dwarf Cavendish’**

tese apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Química, realizada sob a orientação científica do Doutor Armando Silvestre, Professor Associado do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, da Doutora Nereida Cordeiro, Professora Associada do Departamento de Química da Universidade da Madeira e da Doutora Isabel Torres, Professora Associada do Departamento de Ciências da Saúde da Universidade da Madeira

Apoio financeiro da FCT e do FSE no âmbito do III Quadro Comunitário de Apoio.

Aos meus pais, irmãos e Luciano

o júri

presidente

Doutor António Ferreira Pereira de Melo

Professor Catedrático do Departamento de Electrónica, Telecomunicações e Informática

Doutor Dmitry Victorovitch Evtugin

Professor Associado com Agregação da Universidade de Aveiro

Doutora Ana Paula Coelho Duarte

Professora Associada do Departamento de Ciências e Tecnologias do Papel da Universidade da Beira Interior

Doutora Nereida Maria Albano Cordeiro

Professora Associada do Departamento de Química da Universidade da Madeira

Doutor Armando Jorge Domingues Silvestre

Professor Associado da Universidade de Aveiro

Doutora Carmen Sofia da Rocha Freire Barros

Investigadora Auxiliar do CICECO da Universidade de Aveiro

agradecimentos

À Prof. Doutora Nereida Cordeiro, por me ter introduzido no mundo da investigação científica e acreditado em mim desde o início. Agradeço-lhe a orientação científica, o incentivo, disponibilidade e amizade ao longo deste trabalho.

Ao Prof. Doutor Armando Silvestre pela sua boa disposição e palavra amiga, assim como pela confiança em mim depositada, pela orientação científica, pelo incentivo e disponibilidade constantes.

À Prof. Doutora Isabel Torres pelo seu incentivo e apoio.

Ao Prof. Doutor Dmitry Evtuguin pela sua preciosa ajuda na caracterização estrutural das lenhinas assim como pelo seu apoio, disponibilidade e espírito crítico.

Ao Grupo de Tecnologia, na pessoa do Prof. Doutor Carlos Pascoal Neto, pela oportunidade de desenvolver este trabalho na UA e pela disponibilidade de reagentes e equipamentos imprescindíveis à realização do mesmo. Agradeço ainda a forma amiga como sempre fui recebida, fazendo-me sentir em casa.

Ao Prof. Doutor Rogério Simões do Departamento de Engenharia do Papel da UBI, assim como a todos os seus membros, pela disponibilidade das suas instalações no isolamento da Lenhina de Björkman.

À École Française de Papeterie et des Industries Graphiques nas pessoas do Prof. Doutor Naceur Belgacem e da Dra. Marie Christine Salon pela realização dos espectros de RMN de ^{13}C das lenhinas SEA e CEA.

Aos meus colegas e amigos de laboratório do Departamento de Química da UA agradeço o excelente ambiente de trabalho, o apoio e a colaboração em numerosas ocasiões, em particular à Sónia Sequeira, Sara Lisboa, Filipa Xavier, Paula Pinto, Carmen Freire, Sandra Magina, Sofia Santiago e Catarina Esteves.

A todos os elementos do Departamento de Química da UA que, de alguma forma me ajudaram no desenvolvimento deste trabalho, em particular ao Prof. Doutor Artur Silva e aos Técnicos Superiores Paula Esculcas, Hilário Tavares e Celeste Azevedo.

Ao Centro de Estudos da Macaronésia (CEM) da Universidade da Madeira pela disponibilidade de espaços, equipamentos e reagentes, fundamentais para a realização do presente trabalho.

À Direcção Regional de Agricultura e Desenvolvimento Rural da RAM, em particular ao Laboratório de Qualidade Agrícola (LQA) pela realização dos ensaios de azoto orgânico.

À D. Natividade, Sr. Daniel e Lisa pela amizade e carinho sempre demonstrados.

Ao Luciano pelo seu amor, paciência, compreensão e apoio incondicionais em todos os momentos.

Aos meus Pais, Irmãos e Cunhado pelo amor e apoio sempre presentes.

A Deus pelo dom da vida.

À Fundação para a Ciência e Tecnologia pelo apoio financeiro através da concessão da bolsa SFRH/BD/4749/2001.

palavras-chave

Bananeira, *Musa acuminata* Colla, 'Dwarf Cavendish', Composição Química, Extractáveis Lipofílicos, Hemiceluloses, Lenhina

resumo

O principal objectivo deste trabalho é o de contribuir para o conhecimento da composição química e das características estruturais de alguns componentes da bananeira 'Dwarf Cavendish'. Dada a grande abundância dos resíduos produzidos após a colheita do fruto, diferentes partes morfológicas da planta foram alvo de estudo, em particular as folhas (nervuras/pecíolos e limbos), o pseudo-tronco (bainhas foliares e talo floral) e o ráquis. A composição das cinco partes morfológicas foi analisada sumariamente. Os componentes das cinco partes morfológicas em estudo foram isolados segundo a metodologia específica para os extractáveis, polissacarídeos e lenhina. Os extractáveis lipofílicos foram analisados por GC-MS antes e após hidrólise alcalina. As hemiceluloses foram caracterizadas por RMN de ^1H e GPC. As lenhinas foram caracterizadas por análise elementar, determinação de grupos metoxilo, oxidação com permanganato e nitrobenzeno, FTIR, RMN CP/MAS de ^{13}C , UV, Py-GC/MS, RMN de ^{13}C e ^1H e GPC.

Em termos de composição química as várias partes morfológicas revelaram diferenças significativas. A maioria das fracções apresenta como constituinte maioritário a holocelulose, com excepção do talo floral que apresenta como componente mais abundante o amido. De entre as partes morfológicas com teor superior em celulose destacam-se as bainhas foliares assim como as nervuras/pecíolos e o ráquis. Relativamente aos outros componentes, destacam-se os elevados teores de cinzas e de extractáveis, em particular no talo floral e no ráquis e o baixo teor em lenhina na maioria das partes, com excepção dos limbos.

A composição dos monossacarídeos indica que as hemiceluloses das várias regiões morfológicas apresentam estruturas distintas. As hemiceluloses A (HA) deverão ser constituídas essencialmente por glucuronoxilanas e arabinoglucuronoxilanas. Em relação às hemiceluloses B, na maioria das regiões morfológicas, a xilose e a glucose são os monossacarídeos maioritários, indicando a presença de xiloglucanas, α -arabinanas e de arabinoxiloglucanas. Paralelamente, a análise por RMN de ^1H revela a presença de ácido 4-O-metil- α -D-glucurónico, que sugere a existência de ácidos urónicos nas amostras em questão, em particular nas hemiceluloses A das nervuras/pecíolos, dos limbos e do ráquis.

As várias partes morfológicas e em particular os limbos (5%) apresentam teores significativos de extractáveis lipofílicos. As famílias maioritárias nos extractos em diclorometano são as dos ácidos gordos e esteróis, seguidas pelas dos álcoois alifáticos e compostos aromáticos. Alguns destes compostos foram identificados em ambas as formas livre e esterificada assim como na forma de glucosídeos.

O elevado aumento no teor de ácidos gordos e de ácido ferúlico livres após a hidrólise alcalina dos extractos lipofílicos, sugere que uma fracção substancial destes compostos deverá estar envolvida em ligações do tipo éster, embora a quantidade de compostos esterificados detectados nas várias regiões morfológicas não justifique o aumento verificado. Uma explicação possível é a existência de ligações éster com estruturas de elevado peso molecular do tipo cutina e/ou suberina, não detectáveis por GC-MS.

As lenhinas das várias partes morfológicas da 'Dwarf Cavendish' foram isoladas por acidólise suave, método este que demonstrou ser mais adequado para o estudo de caracterização estrutural de lenhinas deste tipo de plantas comparativamente com o método de Björkman, do qual resultaram baixos rendimentos e lenhinas altamente contaminadas por hidratos de carbono e extractáveis. Para obtenção de uma lenhina com maior pureza, o método de isolamento mais apropriado consiste no método de acidólise modificado (com renovação de solvente) aplicado ao material de partida com pré-extracção alcalina.

O facto das lenhinas, mesmo após purificação, se apresentarem contaminadas por compostos alifáticos, em particular as dos limbos, das bainhas foliares e do talo floral, reforça a ideia que estas deverão encontrar-se ligadas quimicamente nos tecidos celulares a componentes do tipo cutina/suberina, provavelmente por ligações éster via resíduos de ácidos hidroxicinâmicos.

As lenhinas das várias partes morfológicas são do tipo HGS, com a lenhina do ráquis a apresentar o teor mais elevado de unidades S, os limbos e o talo floral de unidades G e o talo floral, bainhas foliares e ráquis de unidades H. Paralelamente às unidades do tipo H, G e S, os estudos realizados mostram que as várias lenhinas apresentam na sua composição ácidos hidroxicinâmicos, nomeadamente unidades terminais de ácido *p*-cumárico, as quais se encontram envolvidas maioritariamente em ligações éster quer com a lenhina quer com compostos alifáticos. As lenhinas das nervuras/peciolos e ráquis possuem as mais altas proporções de estruturas não condensadas com grupo hidroxilo fenólico livre. Por outro lado, a abundância de estruturas do tipo β -O-4 é significativamente inferior nas lenhinas dos limbos e talo floral, comparativamente com as restantes fracções.

A título de conclusão, os resultados deste trabalho demonstram que as diferentes partes morfológicas da bananeira em estudo apresentam características químicas e estruturais distintas, implicando a sua utilização da forma mais racional e mais eficiente, uma separação prévia das várias fracções, consoante a aplicação industrial a dar.

keywords

Banana Plant, *Musa acuminata* Colla, 'Dwarf Cavendish', Chemical Composition, Lipophilic Extractives, Hemicelluloses, Lignin

abstract

The main goal of this work is to contribute to the knowledge of the chemical composition and the structural characterization of several components of banana plant 'Dwarf Cavendish'. Due to the high abundance of residues produced after the harvesting of banana, different morphological fractions of the plant were studied such as the foliage (petioles/midrib and leaf blades), pseudo-stem (leaf sheaths and floral stalk) and rachis. The chemical composition of these fractions was studied.

The components of the studied morphological regions were isolated by specific established methods for extractives, polysaccharides and lignin.

Lipophilic extractives were analysed by GC-MS before and after alkaline hydrolysis. Hemicelluloses were characterized by ^1H NMR and GPC. Lignins were characterized by elemental analysis, methoxyl groups content, permanganate and nitrobenzene oxidations, FTIR, ^{13}C NMR CP/MAS, UV, Py-GC/MS, ^{13}C and ^1H RMN and GPC.

The chemical composition of the various morphological regions revealed significative differences. In the majority of the morphological fractions holocellulose was the major component, except for floral stalk that presents starch as the most abundant one. The morphological regions with a high content of cellulose are petioles/midrib and rachis. High contents of ashes and extractives were observed, mainly in floral stalk and rachis, whereas lignin was detected in small amounts in almost the fractions, except in leaf blades.

The chemical analysis of monosaccharides suggested that the isolated hemicelluloses should have different structures. Hemicelluloses A (HA) seem to be constituted essentially by glucuronoxylans and arabinoglucuronoxylans. Hemicelluloses B, otherwise, due to the presence of higher amounts of xylose and glucose should be constituted by xyloglucans, α -arabinans and arabinoxyloglucans. The ^1H NMR analysis revealed the presence of 4-O-methyl- α -D-glucuronic acid, existence of uronic acids in the samples, particularly in hemicelluloses A of petioles/midrib, leaf blades and rachis.

All the morphological fractions presented a high content of extractives, namely leaf blades (5%). The major families in the dichloromethane extracts were fatty acids and sterols, followed by long chain aliphatic alcohols and aromatic compounds. Some of these compounds were identified in the free and esterified forms as well as glucosides. The significant increase in the ferulic and fatty acids content after the alkaline hydrolysis, suggest that a fraction of these compounds should be involved in ester linkages. However, the amount of esterified compounds present in the various morphological regions does not fully explain this raise. A possible explanation is the existence of ester linkages with non-volatile high molecular weight suberin or cutin type structures, not detected by GC-MS.

The lignins of the various morphological regions of 'Dwarf Cavendish' were isolated by the acidolysis method. This method when compared with the Björkman one, where low yields and lignins contaminated by carbohydrates and extractives were obtained, proved to be more suitable to the structural study of the lignin.

In order to obtain a lignin with a higher purity degree, the most appropriate isolation procedure involve the acidolysis method (with solvent renovation) applied to the alkaline pre-extracted material.

The contamination of the purified lignins by aliphatic compounds, suggests that these lignins, particularly the leaf blades, leaf sheaths and floral stalk lignins should be probably chemically linked in cellular tissues by ester linkages to components of the kind of cutin/suberin, through hydroxycinnamic acid residues.

The lignins of the various morphological regions are of HGS type, with rachis lignin richer in S units, leaf blades and floral stalk in G units and floral stalk, leaf sheaths and rachis in H units. These lignins presented also hydroxycinnamic acids, namely terminal *p*-coumaric acid units, which are mostly involved in ester linkages with lignin and aliphatic compounds. Petioles/midrib and rachis lignins have the highest proportions of noncondensed structures with a free phenolic hydroxyl group. On the other hand, the abundance of β -O-4 structures is significantly lower in leaf blades and floral stalk lignins.

The results of this work show that the different morphological regions of 'Dwarf Cavendish' present distinct chemical and structural characteristics. Their reutilization can be more rational and efficient if these fractions are previously separated, according to the required industrial application.

ABREVIATURAS

AACL	Álcoois Alifáticos de Cadeia Longa
AC	Ácido <i>p</i> -Cumárico
AF	Ácido Ferúlico
AG	Ácidos Gordos
AH	Antes de Hidrólise Alcalina
Araf	Arabinofuranose
CA	Compostos Aromáticos
CEA	Com pré-extracção alcalina
DH	Depois de Hidrólise Alcalina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO-d⁶	Dimetilsulfóxido deuterado
ESI-MS	Espectrometria de massa com Ionização por Electrospray
FID	Detector de ionização de chama
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier
ATR	Atenuação da Reflexão Total
G	Unidade de guaiacilpropano
GC	Cromatografia de gás
GC-MS	Cromatografia de gás acoplada à Espectrometria de massa
Glcp	Glucopirranose
GPC	Cromatografia de Permeação em Gel
H	Unidade de <i>p</i> -hidroxifenilpropano
HA	Hemicelulose A
HSQC	Correlação espectroscópica heteronuclear, bidimensional em RMN (detecção inversa)
i.d.	Diâmetro interno
IV	Espectroscopia de Infravermelho
LB	Lenhina de Björkman
LB_{NP}	Lenhina de Björkman das Nervuras/Pecíolos
LB_L	Lenhina de Björkman dos Limbos
LB_{TF}	Lenhina de Björkman do Talo Floral
LB_{BF}	Lenhina de Björkman das Bainhas Foliares
LB_R	Lenhina de Björkman do Ráquis
LD_e	Lenhina Dioxano das Bainhas Foliares purificada extraída com clorofórmio

LD_{ne}	Lenhina Dioxano das Bainhas Foliares purificada mas não extraída com clorofórmio
LD_{BF_np}	Lenhina Dioxano das Bainhas Foliares isolada a partir do material SEA e não purificada
LD_{BF_P1}	Lenhina Dioxano das Bainhas Foliares SEA purificada pelo Método 1
LD_{BF_P2}	Lenhina Dioxano das Bainhas Foliares SEA purificada pelo Método 2
LD_{e_NP}	Lenhina Dioxano das Nervuras/Pecíolos purificada com dioxano/metanol e extraída com clorofórmio
LD_{e_L}	Lenhina Dioxano dos Limbos purificada com dioxano/metanol e extraída com clorofórmio
LD_{e_TF}	Lenhina Dioxano do Talo Floral purificada com dioxano/metanol e extraída com clorofórmio
LD_{e_BF}	Lenhina Dioxano das Bainhas Foliares purificada com dioxano/metanol e extraída com clorofórmio
LD_{e_R}	Lenhina Dioxano do Ráquis purificada com dioxano/metanol e extraída com clorofórmio
LD_{ne_BF}	Lenhina Dioxano das Bainhas Foliares purificada com dioxano/metanol e não extraída com clorofórmio
LD_{CEA}	Lenhina Dioxano isolada a partir do material com pré-extracção alcalina
LD_{CEA_NP}	Lenhina Dioxano isolada a partir do material com pré-extracção alcalina das Nervuras/Pecíolos
LD_{CEA_L}	Lenhina Dioxano isolada a partir do material com pré-extracção alcalina dos Limbos
LD_{CEA_TF}	Lenhina Dioxano isolada a partir do material com pré-extracção alcalina do Talo Floral
LD_{CEA_BF}	Lenhina Dioxano isolada a partir do material com pré-extracção alcalina das Bainhas Foliares
LD_{CEA_R}	Lenhina Dioxano isolada a partir do material com pré-extracção alcalina do Ráquis
LD_{SEA}	Lenhina Dioxano isolada a partir do material sem pré-extracção alcalina
LD_{SEA_NP}	Lenhina Dioxano isolada a partir do material sem pré-extracção alcalina das Nervuras/Pecíolos
LD_{SEA_L}	Lenhina Dioxano isolada a partir do material sem pré-extracção alcalina dos Limbos

LD_{SEA_TF}	Lenhina Dioxano isolada a partir do material sem pré-extracção alcalina do Talo Floral
LD_{SEA_BF}	Lenhina Dioxano isolada a partir do material sem pré-extracção alcalina das Bainhas Foliares
LD_{SEA_R}	Lenhina Dioxano isolada a partir do material sem pré-extracção alcalina do Ráquis
m/z	Razão massa/carga
MeGlcA	Ácido 4- <i>O</i> -metil- α -D-glucurónico
nC:C	Razão entre estruturas não condensadas e condensadas
\overline{M}_w	Peso Molecular Médio Ponderado
Py-GC/MS	Pirólise acoplada a Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massa
RAM	Região Autónoma da Madeira
RMN de ^{13}C	Ressonância Magnética Nuclear de carbono 13
RMN CP/MAS ^{13}C	Ressonância Magnética Nuclear de carbono 13 de polarização cruzada combinada com rotação segundo o ângulo mágico
RMN de ^1H	Ressonância Magnética Nuclear de protão
S	Unidade de seringilpropano
SEA	Sem pré-extracção alcalina
ST	Esteróis
TGA	Análise Termogravimétrica
TMS	Trimetilsililado
TOCSY	Espectroscopia de Correlação Total
ufp	Unidade fenilpropano
UV	Espectroscopia de ultra-violeta
δ	Desvio químico (ppm)
XXXG	Xilose-xilose-xilose-glucose
XXGG	Xilose-xilose-glucose-glucose
Xilp	Xilopiranose

ÍNDICE

PREÂMBULO	1
1. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A BANANEIRA	5
1.1. Descrição Geral e Ciclo Vegetativo da Bananeira	5
1.2. Perspectiva Histórica e Económica	9
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1. Estrutura da Parede Celular das Plantas	13
2.2. Estrutura Anatômica	15
2.2.1. Folhas	15
2.2.2. Pseudo-Tronco	16
2.2.3. Ráquis	17
2.3. Constituintes Químicos das Plantas	18
2.3.1. Composição Química	18
2.3.2. Extractáveis	19
2.3.3. Extractáveis Lipofílicos	20
2.3.3.1. Compostos Alifáticos	20
2.3.3.2. Terpenos e Terpenóides	20
2.3.3.3. Compostos Fenólicos	25
2.3.4. Cutina e Suberina	28
2.3.5. Polissacarídeos	30
2.3.5.1. Celulose	30
2.3.5.2. Hemiceluloses	32
2.3.6. Lenhina	36
2.4. Aplicações Tecnológicas da Bananeira/Enquadramento do trabalho	44
3. MATERIAIS E MÉTODOS	47
3.1. Amostragem/ Preparação das amostras para análise	47
3.2. Metodologia analítica	47
3.3. Caracterização Química Sumária do Material de Partida	48
3.3.1. Espectroscopia de FTIR-ATR	48

3.3.2. Espectroscopia de RMN CP/MAS de ^{13}C	48
3.3.3. Teor em água	48
3.3.4. Cinzas	48
3.3.5. Extractáveis	49
3.3.6. Proteínas	49
3.3.7. Lenhina de Klason e lenhina solúvel	50
3.3.8. Pentosanas	51
3.3.9. Celulose de Kürschner-Hoffner	51
3.3.10. Amido	52
3.3.11. Holocelulose	52
3.3.12. Hemiceluloses	53
3.3.13. α - Celulose	54
3.3.14. Açúcares Neutros	54
3.4. Isolamento e Caracterização dos Extractáveis Lipofílicos	55
3.4.1. Extracção	55
3.4.2. Hidrólise Alcalina	55
3.4.3. Caracterização Estrutural	55
3.5. Caracterização estrutural das hemiceluloses A e B	56
3.5.1. Teor em cinzas e monossacarídeos	56
3.5.2. Espectroscopia de RMN de ^1H	57
3.5.3. Cromatografia de Permeação em Gel	57
3.6. Isolamento e Caracterização Estrutural da Lenhina	57
3.6.1. Isolamento das lenhinas	57
3.6.1.1. Isolamento da Lenhina de Björkman	57
3.6.1.2. Extracção Alcalina	58
3.6.1.3. Isolamento da Lenhina por Acidólise	59
3.6.2. Purificação da lenhina	60
3.6.3. Extracção da Lenhina com Clorofórmio	60
3.6.4. Análise preliminar das Lenhinas	60
3.6.5. Caracterização Estrutural da Lenhina	61
3.6.5.1. Espectroscopia de FTIR	61
3.6.5.2. Espectroscopia de RMN	61

3.6.5.3. PY-GC/MS	62
3.6.5.4. Oxidação com Nitrobenzeno	63
3.6.5.5. Oxidação com Permanganato	64
3.6.5.6. Cromatografia de Permeação em Gel	66
4. DISCUSSÃO DE RESULTADOS.....	67
4.1. Caracterização das Várias Partes Morfológicas da Bananeira	67
4.1.1. Espectroscopias de FTIR e de RMN CP/MAS de ^{13}C	67
4.1.2. Composição Química	73
4.1.2.1. Cinzas	74
4.1.2.2. Extractáveis	75
4.1.2.3. Proteínas	77
4.1.2.4. Lenhina	77
4.1.2.5. Polissacarídeos	78
4.1.3. Conclusão	81
4.2. Extractáveis Lipofílicos.....	83
4.2.1. Ácidos Gordos	87
4.2.2. Esteróis	96
4.2.3. Álcoois Alifáticos	103
4.2.4. Conclusão	108
4.3. Hemiceluloses.....	110
4.3.1. Análise dos açúcares neutros.....	110
4.3.2. Análise estrutural das hemiceluloses A e B por RMN de ^1H	111
4.3.3. Cromatografia de Permeação em Gel das Hemiceluloses A e B.....	117
4.3.4. Conclusão	119
4.4. Lenhina	121
4.4.1. Caracterização das lenhinas <i>in situ</i>	122
Oxidação com nitrobenzeno	122
Oxidação com permanganato	124
4.4.2. Caracterização das Lenhinas de Björkman.....	128
Espectroscopia de RMN CP/MAS de ^{13}C	129
Pirólise acoplada a GC/MS	131
Cromatografia de Permeação em Gel.....	135

4.4.3. Caracterização das Lenhinas Dioxano	137
4.4.3.1. Lenhinas Dioxano – Parte I.....	139
Efeito da extracção com clorofórmio	141
Caracterização estrutural dos extractos em clorofórmio	146
Caracterização Estrutural das Lenhinas Dioxano LD _e	151
Espectroscopia de FTIR e de RMN CP/MAS de ¹³ C.....	151
Espectroscopia de Ultravioleta/Visível	155
Fórmula Empírica.....	156
Oxidação com permanganato	157
Cromatografia de Permeação em Gel.....	159
Espectroscopia de RMN de ¹³ C.....	160
Espectroscopia de RMN de ¹ H.....	166
4.4.3.2. Lenhinas Dioxano – Parte II.....	170
Efeito da purificação	170
Caracterização das lenhinas Dioxano LD _{SEA} e LD _{CEA}	175
Espectroscopia de RMN CP/MAS de ¹³ C	176
Fórmula Empírica.....	178
Oxidação com permanganato	179
Cromatografia de Permeação em Gel.....	182
Espectroscopia de RMN de ¹³ C.....	183
Espectroscopia de RMN de ¹ H.....	189
4.4.4. Conclusão	193
5. CONCLUSÃO	197
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	203

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Partes constituintes de uma bananeira.....	5
Figura 1.2. Corte transversal e longitudinal do pseudo-tronco.....	6
Figura 1.3. Partes constituintes da inflorescência terminal.	7
Figura 1.4. Valores estimados da evolução da produção de banana na RAM entre 1976 e 2004.	10
Figura 1.5. Mapa de distribuição da cultura da bananeira na Madeira em 1989.....	11
Figura 2.1. Representação esquemática de uma parede celular.	13
Figura 2.2. Esquema de uma secção transversal de uma folha da monocotiledónea <i>Zea mays</i>	15
Figura 2.3. Secção transversal de uma fibra de bananeira extraída das bainhas foliares da <i>Musa sapientum</i>	16
Figura 2.4. Plano transversal do centro e periferia do ráquis da bananeira ‘Dwarf Cavendish’.....	17
Figura 2.5. Estruturas de alguns dos compostos alifáticos mais comuns.	20
Figura 2.6. Monoterpenos e sesquiterpenos identificados no pseudo-tronco da cultivar “githumo”.	21
Figura 2.7. Exemplos de 4-desmetil esteróis (Δ^5 , Δ^7 e $\Delta^{5,7}$) mais comuns das plantas.	22
Figura 2.8. Exemplos de esteróis conjugados existentes nas plantas.	23
Figura 2.9. Exemplos de alguns esteróis identificados em várias partes da <i>Musa sapientum</i>	24
Figura 2.10. Estrutura da cetona triterpénica e do triterpenóide tetracíclico identificados nas flores da <i>Musa paradisiaca</i>	24
Figura 2.11. Estruturas de glucosídeos de esterilo e acil-glucosídeos de esterilo identificados no fruto da <i>Musa paradisiaca</i>	25
Figura 2.12. Estruturas de alguns ácidos fenólicos.	26
Figura 2.13. Antocianidinas mais comuns existentes na natureza.	26
Figura 2.14. Estruturas dos 3,4-flavanodióis identificados nas sementes da <i>Musa sapientum</i>	27
Figura 2.15. Exemplos de um tanino hidrolisável (elagitanino) e condensado.....	28

Figura 2.16. Modelo proposto por Kolattukudy indicativo do tipo de estruturas presentes numa cutina contendo como monómeros maioritários os da família C16.	29
Figura 2.17. Estrutura de uma cadeia de celulose.	31
Figura 2.18. Célula unitária da celulose I e planos da célula unitária da celulose I.....	32
Figura 2.19. Estrutura molecular de uma <i>O</i> -acetil-4- <i>O</i> -metilglucuronoxilana.	33
Figura 2.20. Estrutura molecular de uma galactoglucomanana.	33
Figura 2.21. Estrutura da amilose e da amilopectina.	34
Figura 2.22. Estrutura de uma arabinoxilana de gramíneas.	35
Figura 2.23. Monómeros precursores da lenhina: I. álcool <i>p</i> -cumarílico; II. álcool coniferílico e III. álcool sinapílico.	36
Figura 2.24. Radicais fenoxilo do álcool coniferílico formados por desidrogenação enzimática e estabilizados por ressonância.	37
Figura 2.25. Ligações mais comuns entre as unidades fenilpropano na lenhina.	38
Figura 2.26. Modelo estrutural proposto para a lenhina da faia (<i>Fagus sylvatica</i>).	40
Figura 2.27. Tipo de ligações mais frequentes entre a lenhina e os polissacarídeos.	41
Figura 2.28. Representação esquemática da relação entre a formação/deposição dos polímeros da parede celular e o processo heterogéneo de lenhificação.	42
Figura 4.1. Espectros de FTIR-ATR das várias partes morfológicas da ‘Dwarf Cavendish’ antes e após extracção com diclorometano, etanol/tolueno e água.	68
Figura 4.2. Espectros de RMN CP/MAS de ¹³ C das várias partes morfológicas da ‘Dwarf Cavendish’ antes e após extracção com diclorometano, etanol/tolueno e água.	70
Figura 4.3. Teor de extractáveis em diclorometano obtido nas diferentes partes morfológicas da bananeira ‘Dwarf Cavendish’.....	84
Figura 4.4. Cromatogramas dos extractos em diclorometano derivatizados das bainhas foliares da ‘Dwarf Cavendish’ antes e depois a hidrólise alcalina.....	85
Figura 4.5. Famílias de compostos identificadas nos extractos em diclorometano da ‘Dwarf Cavendish’ antes e depois da hidrólise alcalina.	86
Figura 4.6. Espectros de massa dos derivados TMS dos ácidos hexadecanóico e oleico... 89	89
Figura 4.7. Espectro de massa do derivado TMS do ácido 22-hidroxidocosanóico 90	90
Figura 4.8. Espectro de massa do derivado TMS do ácido 2-hidroxidocosanóico. 91	91
Figura 4.9. Ácidos gordos identificados no extracto em diclorometano da ‘Dwarf Cavendish’ antes e depois da hidrólise alcalina.	92

Figura 4.10. Cromatograma do extracto em diclorometano das bainhas foliares antes da hidrólise alcalina obtido com a coluna curta (15 m).	93
Figura 4.11. Espectro de massa do derivado TMS do 1-(24-tetracosanoil)glicerol.	94
Figura 4.12. Espectro de massa do derivado TMS do ferulato de docosanoílo.	94
Figura 4.13. Espectro de massa do octadecanoato de 24-metilenocicloartenilo.	95
Figura 4.14. Estruturas dos esteróis identificados na bananeira ‘Dwarf Cavendish’	97
Figura 4.15. Espectro de massa do derivado TMS do campesterol.....	98
Figura 4.16. Espectros de massa dos derivados trimetilsililado e acetilado do 24-metilenopolinastanol.....	98
Figura 4.17. Espectros de massa da 31-norciclolaudenona e da cicloeucalenona.....	99
Figura 4.18. Espectro de massa do derivado TMS do cicloeucalenol.....	100
Figura 4.19. Expansão do cromatograma do extracto em diclorometano das bainhas foliares antes da hidrólise alcalina obtido com a coluna curta (15 m) correspondente à região D da Figura 4.10.	101
Figura 4.20. Estrutura do 3- β -D-glucopiranosídeo de campesterilo, estigmasterilo e β -sitosterilo.	101
Figura 4.21. Espectro de massa do derivado TMS do glucosídeo de β -sitosterilo.....	102
Figura 4.22. Espectro de massa do derivado sililado do 1-triacontanol.....	104
Figura 4.23. Espectro de massa do derivado TMS do α -tocoferol.....	107
Figura 4.24. Espectros de RMN de ^1H das hemiceluloses A das várias partes morfológicas em estudo.....	112
Figura 4.25. Espectros de RMN de ^1H das hemiceluloses B das várias partes morfológicas em estudo.....	113
Figura 4.26. Cromatogramas de permeação em gel das hemiceluloses A das várias partes morfológicas da ‘Dwarf Cavendish’	118
Figura 4.27. Cromatogramas de permeação em gel das hemiceluloses B das várias partes morfológicas da ‘Dwarf Cavendish’	118
Figura 4.28. Produtos obtidos na oxidação da lenhina <i>in situ</i> com nitrobenzeno.	122
Figura 4.29. Ésteres metílicos dos produtos da oxidação da lenhina <i>in situ</i> com permanganato.	125
Figura 4.30. Espectros de RMN CP/MAS ^{13}C das lenhinas de Björkman.....	130
Figura 4.31. Pirograma referente à lenhina de Björkman das nervuras/peciolas LB _{NP}	132

Figura 4.32. Cromatogramas de permeação em gel das lenhinas de Björkman.....	135
Figura 4.33. Espectro de FTIR da lenhina dioxano das bainhas foliares LD _{BF} não purificada.....	139
Figura 4.34. Espectros de FTIR das lenhinas dioxano LD _{ne_BF} e LD _{e_BF}	142
Figura 4.35. Espectros de RMN CP/MAS de ¹³ C das lenhinas dioxano LD _{ne_BF} e LD _{e_BF}	142
Figura 4.36. Espectros de UV-Visível das lenhinas dioxano LD _{ne_BF} e LD _{e_BF}	144
Figura 4.37. Cromatogramas de permeação em gel das lenhinas dioxano LD _{ne_BF} e LD _{e_BF}	144
Figura 4.38. Cromatograma do extracto em clorofórmio hidrolisado da lenhina dioxano LD _{ne_BF}	146
Figura 4.39. Estrutura do composto X.	150
Figura 4.40. Cromatogramas de permeação em gel dos extractos em clorofórmio das lenhinas LD _{ne}	151
Figura 4.41. Espectros de FTIR das lenhinas dioxano LD _e	152
Figura 4.42. Espectros de RMN CP/MAS de ¹³ C das lenhinas dioxano LD _e	153
Figura 4.43. Espectros de UV-Visível das lenhinas dioxano LD _e	155
Figura 4.44. Cromatogramas de permeação em gel das lenhinas dioxano LD _e das várias partes morfológicas da ‘Dwarf Cavendish’.....	159
Figura 4.45. Espectros de RMN de ¹³ C quantitativo das lenhinas LD _{e_NP} , LD _{e_BF} e LD _{e_R}	161
Figura 4.46. Espectro de RMN de ¹³ C quantitativo da lenhina acetilada LD _{e_TF}	161
Figura 4.47. Espectros de RMN de ¹ H das lenhinas dioxano LD _e acetiladas.	168
Figura 4.48. Espectros de FTIR e de RMN CP/MAS de ¹³ C das lenhinas dioxano das bainhas foliares.....	171
Figura 4.49. Espectros de RMN de ¹³ C quantitativo das lenhinas LD _{BF_P1} e LD _{BF_P2}	173
Figura 4.50. Espectros de RMN de ¹ H das lenhinas dioxano LD _{BF_P1} e LD _{BF_P2}	174
Figura 4.51. Espectros de RMN CP/MAS ¹³ C das lenhinas dioxano isoladas a partir do material SEA (LD _{SEA}) e CEA (LD _{CEA}).	177
Figura 4.52. Cromatogramas de permeação em gel das lenhinas dioxano LD _{SEA} e LD _{CEA}	182
Figura 4.53. Espectros de RMN de ¹³ C quantitativo das lenhinas dioxano LD _{SEA}	187

Figura 4.54. Espectros de RMN de ^{13}C quantitativo das lenhinas dioxano LD_{CEA}	188
Figura 4.55. Espectros de RMN de ^1H das lenhinas LD_{SEA} acetiladas.....	190
Figura 4.56. Espectros de RMN de ^1H das lenhinas dioxano LD_{CEA} acetiladas.	191

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1. Aplicações das várias partes da bananeira.....	8
Tabela 2.1. Composição química do material bruto e fibras extraídas do pseudo-tronco e do ráquis de várias variedades de <i>Musa acuminata</i> Colla (%).....	18
Tabela 2.2. Composição mineral das cinzas das folhas e do pseudo-tronco de diferentes espécies de <i>Musa</i>	19
Tabela 4.1. Atribuições das absorções vibracionais de FTIR das várias partes morfológicas da bananeira, com base em estudos prévios.	69
Tabela 4.2. Atribuição dos sinais de RMN de ^{13}C do estado sólido nas várias partes morfológicas da bananeira ‘Dwarf Cavendish’, com base em estudos prévios.	71
Tabela 4.3. Teor de água (%) em cada parte morfológica em estudo.	73
Tabela 4.4. Composição química das diferentes regiões morfológicas da ‘Dwarf Cavendish’ (% relativa ao material seco com extractáveis).	74
Tabela 4.5. Composição dos elementos minerais das cinzas obtidas nas diferentes partes da ‘Dwarf Cavendish’ (% m elemento/m cinzas).	75
Tabela 4.6. Composição sumária dos extractos em água das diferentes regiões morfológicas da ‘Dwarf Cavendish’ (% m/m: percentagem de cada componente no extracto em água).	76
Tabela 4.7. Composição média em monossacarídeos (% molar) do material sem extractáveis das diferentes partes morfológicas da ‘Dwarf Cavendish’.....	78
Tabela 4.8. Famílias dos componentes lipofílicos identificados nos extractos em diclorometano da ‘Dwarf Cavendish’ e o seu teor antes (AH) e depois (DH) da hidrólise alcalina do extracto (mg de composto/Kg de material seco).	86
Tabela 4.9. Ácidos gordos (mg de composto/Kg de material seco) identificados nos extractos em diclorometano das diferentes partes morfológicas da ‘Dwarf Cavendish’: antes (AH) e depois (DH) da hidrólise alcalina.....	88
Tabela 4.10. Esteróis (mg de composto/Kg de material seco) identificados nos extractos em diclorometano das diferentes partes morfológicas da ‘Dwarf Cavendish’, antes (AH) e depois (DH) da hidrólise alcalina.	96
Tabela 4.11. Glucosídeos de esterilo identificados nas várias partes morfológicas da ‘Dwarf Cavendish’ (mg de composto/Kg de material seco).	102

Tabela 4.12. Álcoois Alifáticos de Cadeia Longa (AACL) (mg de composto/Kg de material seco) identificados nos extractos em diclorometano das diferentes partes morfológicas da ‘Dwarf Cavendish’, antes (AH) e depois (DH) da hidrólise alcalina.....	104
Tabela 4.13. Compostos aromáticos (mg de composto/Kg de material seco) identificados nos extractos em diclorometano das diferentes partes morfológicas da ‘Dwarf Cavendish’, antes (AH) e depois (DH) da hidrólise alcalina.	105
Tabela 4.14. Outros componentes (mg de composto/Kg de material seco) presentes nos extractos em diclorometano das diferentes partes morfológicas da ‘Dwarf Cavendish’, antes (AH) e depois (DH) da hidrólise alcalina.	107
Tabela 4.15. Composição média em monossacarídeos (fracção molar, mol %) nas HA e HB das várias partes morfológicas da ‘Dwarf Cavendish’.	110
Tabela 4.16. Desvios químicos de RMN de ^1H referentes aos resíduos de xilose.....	115
Tabela 4.17. Peso molecular médio ponderado das hemiceluloses A e B das várias amostras em estudo (nos cálculos do \overline{M}_w das hemiceluloses A foi incluído apenas o pico de eluição entre os 13.5 e 18.5 min).....	119
Tabela 4.18. Resultados obtidos da oxidação com nitrobenzeno das lenhinas <i>in situ</i> do material SEA e CEA (Figura 4.28).	123
Tabela 4.19. Resultados da oxidação com permanganato das lenhinas <i>in situ</i> do material SEA e CEA (Figura 4.29).	126
Tabela 4.20. Rendimentos de extracção das lenhinas de Björkman.	129
Tabela 4.21. Atribuição dos principais sinais de RMN de ^{13}C de estado sólido de lenhinas, com base em estudos prévios.	131
Tabela 4.22. Quantidade relativa (%) dos produtos identificados por pirólise das lenhinas de Björkman.	133
Tabela 4.23. Quantidade relativa (%) dos produtos identificados por pirólise das lenhinas de Björkman.	134
Tabela 4.24. Peso molecular médio ponderado (\overline{M}_w) das lenhinas de Björkman.....	136
Tabela 4.25. Rendimentos de extracção das lenhinas dioxano.	140
Tabela 4.26. Análise elementar, percentagem de metoxilos e fórmulas empíricas das ufp da lenhina das bainhas foliares antes ($\text{LD}_{\text{ne_BF}}$) e após ($\text{LD}_{\text{e_BF}}$) extracção com clorofórmio.....	141

Tabela 4.27. Resultados da oxidação com permanganato das lenhinas dioxano das bainhas foliares antes e após extracção com clorofórmio (Figura 4.29).	145
Tabela 4.28. Compostos (mg de composto/g de extracto) identificados nos extractos em clorofórmio das lenhinas dioxano LD _{ne} das diferentes partes morfológicas da ‘Dwarf Cavendish’.....	147
Tabela 4.29. Resultados da oxidação com permanganato dos extractos em clorofórmio das lenhinas LD _{ne} (ver Figura 4.29).....	149
Tabela 4.30. Peso molecular médio ponderado (\overline{M}_w) dos extractos em clorofórmio das lenhinas LD _{ne}	150
Tabela 4.31. Absortividade específica (ϵ) das lenhinas dioxano LD _e	156
Tabela 4.32. Análise elementar, percentagem de grupos metoxilo e fórmulas empíricas das ufp das lenhinas dioxano LD _e da ‘Dwarf Cavendish’.	156
Tabela 4.33. Composição média em monossacarídeos (% m/m, na forma anidra) das lenhinas dioxano LD _e	157
Tabela 4.34. Resultados da oxidação com permanganato das lenhinas dioxano LD _e	158
Tabela 4.35. Peso molecular médio ponderado (\overline{M}_w) das lenhinas dioxano LD _e	159
Tabela 4.36. Principais regiões de integração dos espectros de RMN de ¹³ C de lenhinas não acetiladas e respectivas atribuições.	160
Tabela 4.37. Relações matemáticas utilizadas no estudo quantitativo de lenhinas por RMN de ¹³ C.	162
Tabela 4.38. Frequência de elementos estruturais por anel aromático, obtida por RMN de ¹³ C das lenhinas dioxano LD _e	163
Tabela 4.39. Frequência de elementos estruturais por ufp, obtida por RMN de ¹ H das lenhinas acetiladas.	167
Tabela 4.40. Teor de cinzas e hidratos de carbono nas lenhinas das bainhas foliares LD _{BF_np} , LD _{BF_p1} e LD _{BF_p2}	172
Tabela 4.41. Resultados da oxidação com permanganato das lenhinas dioxano das bainhas foliares LD _{BF_np} , LD _{BF_p1} e LD _{BF_p2}	172
Tabela 4.42. Frequência de elementos estruturais por anel aromático, obtida por RMN de ¹³ C das lenhinas dioxano LD _{BF_p1} e LD _{BF_p2}	173
Tabela 4.43. Frequência de elementos estruturais por ufp, obtida por RMN de ¹ H das lenhinas dioxano acetiladas LD _{BF_p1} e LD _{BF_p2}	174

Tabela 4.44. Rendimentos de extracção das lenhinas dioxano LD _{SEA} e LD _{CEA} antes e após purificação.....	175
Tabela 4.45. Análise elementar, percentagem de metoxilos e fórmulas empíricas das ufp das lenhinas dioxano LD _{SEA} e LD _{CEA}	178
Tabela 4.46. Composição média em monossacarídeos (% m/m, na forma anidra) das lenhinas dioxano LD _{SEA} e LD _{CEA}	179
Tabela 4.47. Resultados da oxidação com permanganato das lenhinas dioxano LD _{SEA} e LD _{CEA} (Figura 4.29).	180
Tabela 4.48. Peso molecular médio ponderado \overline{M}_w das lenhinas dioxano LD _{SEA} e LD _{CEA}	183
Tabela 4.49. Frequência de elementos estruturais por anel aromático, obtida por RMN de ¹³ C das lenhinas dioxano LD _{SEA} e LD _{CEA} (consultar tabelas 4.36 e 4.37).	185
Tabela 4.50. Frequência de elementos estruturais por anel aromático C ₉ , obtida por RMN de ¹ H das dioxano LD _{SEA} e LD _{CEA}	189

PREÂMBULO

A nível mundial, a indústria dos produtos florestais é um sector dinâmico, vital e em grande expansão. Dada a grande procura deste tipo de materiais, em especial nos países mais industrializados, a diminuição das reservas de madeira e o consequente aumento gradual dos custos das matérias primas constituem uma preocupação constante, pelo que o recurso a novas fontes de fibras, como é o caso das fibras de plantas não-lenhosas, tem sido alvo de grande interesse [1].

As plantas anuais de crescimento rápido produtoras de fibra apresentam algumas vantagens sobre as espécies arbóreas tradicionais, nomeadamente no que diz respeito à utilização de desperdícios orgânicos agrícolas (subprodutos agrícolas), renováveis anualmente e disponíveis em grande abundância. Desta forma, os materiais agrícolas são uma fonte abundante e económica de fibras celulósicas.

De facto, dependendo da sua composição e propriedades físicas, as fibras não-lenhosas podem ser apropriadas para aplicações em compósitos, têxteis, manufactura de pasta e papel, assim como na produção de combustível.

De entre as várias plantas de crescimento rápido utilizadas como fonte de fibras, encontra-se a bananeira, objecto de estudo do presente trabalho.

O cultivo da bananeira, sendo esta uma planta que exige calor constante e elevada humidade para o seu desenvolvimento, estende-se a quase todas as regiões tropicais [2]. Actualmente, a Índia é o maior produtor mundial de banana com 16,8 milhões de t/ano, seguido do Equador com 5,4 milhões de t/ano e do Brasil com 5,3 milhões de t/ano [3].

De entre as cultivares de banana existentes, o sub-grupo *Cavendish*, que compreende as variedades ‘Dwarf Cavendish’ e ‘Giant Cavendish’, é o mais produzido e exportado, correspondendo a um pouco mais de um terço da produção mundial de banana [4].

Após a colheita do fruto, são produzidas grandes quantidades de resíduos agrícolas, sendo as folhas, o pseudo-tronco e o ráquis, os mais importantes em termos de volume gerado e como potencial fonte de fibra. Em termos de matéria seca, a actividade bananicultora pode gerar para o sub-grupo *Cavendish* cerca de 8 t/ha de pseudo-tronco, 4,7 t/ha de folha e 0,2 a 0,7 t/ha de ráquis [2].

Apesar destes resíduos desempenharem um papel importante na adubação dos terrenos, em situações de acumulação elevada favorecem a proliferação de insectos e microorganismos biodegradadores, conduzindo a sérios problemas ambientais e fitossanitários [2].

Dada a abundância destes desperdícios agrícolas ao longo de todo o ano nas regiões produtoras de banana, estes subprodutos podem constituir uma fonte importante de fibras, químicos e outros produtos com aplicação industrial. Assim, para além do aproveitamento destes resíduos permitir reduzir os problemas ambientais causados pela destruição dos mesmos, o seu uso em aplicações de maior valor acrescentado poderá ser uma fonte adicional de rendimento para os agricultores, sem afectar a fertilidade dos solos [5].

Na Região Autónoma da Madeira (RAM), a bananeira, dadas as condições agro-climáticas favoráveis à sua plantação e expansão, em particular na Costa Sul da Ilha, constitui actualmente, a cultura de maior importância sócio-económica da Região. Nos últimos anos, a produção de banana tem rondado as 20500 toneladas/ano, sendo Portugal Continental praticamente o único destino da mesma. Grande parte da banana exportada e da consumida localmente é produzida pela cultivar ‘Dwarf Cavendish’ (*Musa acuminata* Colla var. *cavendish*), a qual constitui cerca de 60% da banana total produzida na região.

Devido ao crescente interesse a nível internacional por espécies produtoras de fibras de crescimento rápido, assim como o pouco conhecimento que existe até ao momento sobre a caracterização química dos diversos constituintes nas diferentes regiões morfológicas da bananeira, torna-se fundamental aprofundar o seu conhecimento.

Deste modo, dada a importância do sub-grupo *Cavendish*, quer a nível mundial quer regional, o presente trabalho tem como principal objectivo aprofundar o conhecimento da composição química das partes morfológicas maioritárias (folhas, pseudo-tronco e ráquis) de uma das suas variedades, a ‘Dwarf Cavendish’. Atendendo a que as várias partes morfológicas deverão apresentar diferenças significativas no que se refere à composição química e estrutura dos componentes, o estudo isolado de cada uma das fracções torna-se importante no sentido em que poderá permitir prever e compreender o seu comportamento tecnológico. Deste modo, dependendo das características de cada parte morfológica, estas poderão ser valorizadas isolada ou conjuntamente, consoante as necessidades da aplicação final.

Sendo impossível, neste trabalho, a análise completa de todos os constituintes da planta, a escolha recaiu sobre o estudo de alguns dos componentes principais, que poderão influenciar o comportamento tecnológico da planta em estudo. Esta tese de doutoramento consistiu, deste modo, no estudo da composição química global, seguida de uma análise sumária das hemiceluloses e da caracterização exaustiva dos extractáveis lipofílicos e da lenhina das várias partes em estudo.

Tendo em conta os objectivos da presente tese, este trabalho encontra-se dividido em cinco partes. No primeiro capítulo, dividido em dois sub-capítulos, é efectuada uma contextualização botânica (Sub-capítulo 1.1), histórica e económica da bananeira (Sub-capítulo 1.2) a nível mundial e regional.

O segundo capítulo consiste numa revisão bibliográfica que se encontra dividida em quatro partes. Nos sub-capítulos 2.1 e 2.2 é feita uma pequena introdução acerca da estrutura da parede celular das plantas e da anatomia das regiões morfológicas em estudo; seguido de uma abordagem, no sub-capítulo 2.3, da composição química da bananeira e de uma descrição dos principais componentes dos materiais lenhocelulósicos. No último sub-capítulo (2.4) são apresentados os estudos mais relevantes no que diz respeito às aplicações tecnológicas da bananeira, terminando esta parte com um enquadramento do presente trabalho.

Logo após a descrição dos materiais e métodos no Capítulo 3, segue-se a apresentação e discussão dos resultados (Capítulo 4) que se encontra subdividido em quatro sub-capítulos. Nesta parte são apresentados os resultados referentes à composição química global das várias partes morfológicas em estudo (sub-capítulo 4.1), à caracterização exaustiva dos extractáveis lipofílicos (sub-capítulo 4.2), à análise química e estrutural das hemiceluloses (sub-capítulo 4.3) e à caracterização estrutural das lenhinas das várias fracções em estudo, com recurso a diferentes técnicas e métodos de análise estrutural (sub-capítulo 4.4).

Num quinto e último capítulo, os resultados mais relevantes são sintetizados, constituindo as conclusões finais.

1. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A BANANEIRA

1.1. DESCRIÇÃO GERAL E CICLO VEGETATIVO DA BANANEIRA

A bananeira é uma planta que pertence à divisão Angiospermae, classe Monocotyledoneae, ordem Scitaminae e família Musaceae [6]. Esta família é constituída por dois géneros: *Musa* (bananas comestíveis) e *Ensete* (bananas silvestres), os quais são constituídos por 35 e 7 espécies diferentes, respectivamente. O género *Musa* pode ainda ser dividido em quatro subgéneros (*Australimusa*, *Rhodochlamys*, *Callimusa* e *Eumusa*), sendo no subgénero *Eumusa*, ou simplesmente *Musa*, onde se encontram as espécies de interesse comercial, como é o caso do sub-grupo *Cavendish* [2].

As bananeiras são plantas herbáceas de grande porte, providas de um falso caule ou pseudo tronco que pode atingir, no caso da ‘Dwarf Cavendish’ (*Musa acuminata* Colla var. *cavendish*) cerca de 2 metros de altura (Figura 1.1).



Figura 1.1. Partes constituintes de uma bananeira: 1) Pseudo-tronco da planta “mãe”; 2) Rebento, (“filho” ou “canhota”); 3) Folhas; 4) Cacho e 5) “Pinguelo”, “sino” ou “coração”.

O pseudo-tronco é constituído pelo conjunto rígido das bainhas das folhas imbricadas, dispostas em espiral, apertadas sobre um eixo muito pouco elevado acima do solo, o talo floral (Figura 1.2A,B) [7,8]. A folha é formada pela bainha, pecíolo, nervura central e limbo (Figura 1.2C).

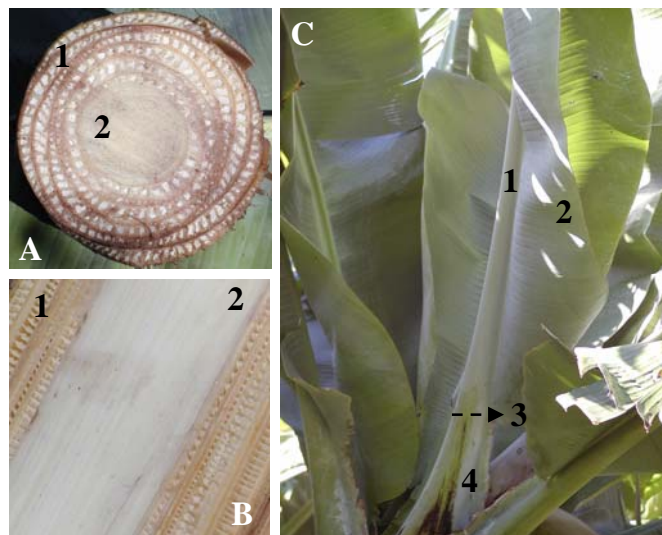


Figura 1.2. Corte transversal (A) e longitudinal (B) do pseudo-tronco: 1. Bainhas Foliares; 2. Talo Floral. Folhas de bananeira (C): 1. Nervura Central; 2. Limbo; 3. Pecíolo e 4. Bainha.

Na base de cada folha localiza-se um gomo, ao nível da inserção da bainha, alguns dos quais, em condições favoráveis, desenvolvem-se originando uma nova planta. Estes lançamentos ou rebentos conhecidos vulgarmente pelo nome de “filhos” ou “canhotas”, garantem a perpetuação da planta de uma forma vegetativa.

Ao conjunto formado pela bananeira “mãe” e pelos vários “filhos” e até “netos” chama-se “touça”, “pé” ou “soca” da bananeira (Figura 1.1) [8].

Após a formação de um número variável de folhas, o referido gomo desenvolve-se, dando lugar ao talo floral, que se alonga interiormente na parte central do pseudo-tronco, até desenvolver uma inflorescência terminal complexa.

A inflorescência é constituída por um ráquis (Figura 1.3A), no qual se encontram dispostos em espiral, os grupos de flores a que se dá o nome de “pencas” ou “mãos”. Cada um dos conjuntos de flores está protegido por uma bráctea, que as cobre completamente antes da floração (Figura 1.3B). Apesar de todas as flores serem hermafroditas, os primeiros grupos de flores (originadoras dos respectivos frutos) são de predominância feminina. Os grupos de flores seguintes, de predominância masculina, situam-se no

extremo da inflorescência e encontram-se cobertas por um conjunto de brácteas. Esta parte terminal é vulgarmente conhecida pelo nome de “pinguelo”, “sino” ou “coração” (Figura 1.3B) [8,9].



Figura 1.3. Partes constituintes da inflorescência terminal :1. Ráquis; 2.“Pencas” ou “mãos”; 3. Bráctea e 4. “Pinguelo”.

Regra geral, num bananal encontram-se plantas em várias fases de desenvolvimento, sendo as colheitas distribuídas ao longo de todo o ano. Contudo, a maior produção ocorre no período mais quente de Julho a Outubro, constituindo cerca de 50% do total da produção anual. A data da primeira colheita, bem como das seguintes, depende fundamentalmente da zona onde a plantação está localizada, sendo que a primeira colheita ocorre, na maioria dos casos, 16 a 19 meses após a data de plantação.

Uma vez efectuada a colheita, a bananeira começa a secar e acaba por morrer, sendo produzidos consequentemente grandes quantidades de resíduos agrícolas.

Devido ao grande volume de resíduos gerado, nas regiões onde esta cultura abunda, os povos ao longo dos tempos deram uso às várias partes morfológicas da bananeira. Existem relatos indicativos que, de facto, quase todas as partes desta planta eram e continuam a ser usadas de várias formas, sendo por isso conhecida como a “planta em que tudo se aproveita” (Tabela 1.1) [7,10].

Tabela 1.1. Aplicações das várias partes da bananeira.

Parte Morfológica	Aplicação
Folhas	Cama de gado, cobertura de palheiros, embalagem de frutos, guarda-chuva, prato, cobertura de mesas, envolvimento da comida durante a sua cozedura, papel de cigarros [7,10] <i>Aplicação terapêutica</i> suster o escoamento sanguíneo, queimaduras [7] <i>Cinzas:</i> preparação de certos pratos, onde melhora o seu sabor e a sua textura [11]
Bainhas Foliares	“Regueiros”, fitas para segurar as videiras depois de podadas, apertar e proteger as enxertias, tapar as juntas de vasilhames de madeira, forrar os batoques das pipas, as buchas dos tanques [7] <i>Fibras:</i> fabrico de peças artesanais, como por exemplo, chapéus, tecidos, cortinas, rendas e tapetes [7,10]; produção de papel e materiais compósitos [12-23]. <i>Cinzas:</i> no aumento do pH de solos ácidos [24].
Talo Floral	Alimentação de gado [7] Produção de cola [10]
Seiva	Envenenamento de setas de caça por certas tribos de Pigmeus [25] Clarificação de açúcar, produção de tinta de escrita [7] <i>Aplicações terapêuticas</i> Tratamento de infeções do peito, “doenças dos olhos” e na contracção/paralisação de músculos [7,25-29]
Ráquis	<i>Aplicações terapêuticas</i> Sudorífero no combate de diarreias fortes [7]
Inflorescência terminal	<i>Aplicações terapêuticas</i> Tratamento de lábios gretados [7]
Flores da inflorescência	<i>Aplicações terapêuticas</i> Tratamento de infeções intestinais [7]
Brácteas	Confecção de determinados pratos [30]

Porém, devido ao desenvolvimento de novos produtos que respondem às necessidades do quotidiano de uma forma mais eficaz e prática, muitas das aplicações referidas anteriormente entraram em desuso.

Na maioria dos casos, os resíduos resultantes da cultura da bananeira, nomeadamente o pseudo-tronco e as folhas, são deixados no solo de forma a manter a sua humidade, controlar plantas daninhas e retornar nutrientes à planta.

O ráquis, por seu lado, é normalmente eliminado no processo de separação dos cachos nas cooperativas agrícolas, onde são realizadas a selecção, a limpeza e a classificação da fruta. Actualmente, os resíduos resultantes das cooperativas são

encaminhados para as lixeiras municipais ou para as Estações de Tratamento de Resíduos Sólidos, como sucede na Região Autónoma da Madeira.

1.2. PERSPECTIVA HISTÓRICA E ECONÓMICA

A banana, um dos mais antigos produtos agrícolas, é oriunda do Sudeste asiático. As suas primeiras referências históricas datam de 500 a 600 anos a.C. na Índia, o que leva a crer que será provavelmente originária de uma região situada entre a Índia e a península oriental da Malásia.

A cultura da banana expandiu-se posteriormente por outras regiões, estando a sua expansão pelo mundo associada ao período dos descobrimentos, altura em que se supõe que os navegantes portugueses, através das suas viagens, começaram a cultivá-la por onde passavam [9].

Sendo uma planta tipicamente tropical, a distribuição geográfica da cultura da bananeira encontra-se compreendida essencialmente entre os paralelos 30° de Latitude Norte e Sul, cujas temperaturas se situam entre os 10 e 40°C. Contudo, podem também ser encontradas em latitudes acima dos 30° (até 45°), desde que a temperatura seja adequada. Devido à sua fácil adaptação, é cultivada em quase todas as regiões tropicais [2].

A introdução da bananeira na Ilha da Madeira ocorreu, provavelmente, no início do século XVI. Até ao século XVII manteve-se como curiosidade botânica, passando desde então, a espécie cultivada a ser utilizada para a produção de frutos.

A sua verdadeira expansão e importância, no contexto da agricultura madeirense, ocorreu no início do século XX com a melhoria dos transportes marítimos, tendo sido iniciadas, na década de 40, as exportações regulares de banana para Portugal Continental, o mercado de destino maioritário da banana produzida na Madeira [31].

Pelo facto desta cultura ser pouco exigente quanto a cuidados de tratamento e de permitir colheitas quinzenais regulares, a sua cultura depressa se expandiu na região, tornando-se desta forma bastante rentável e gerando um rendimento repartido ao longo do ano [32].

Contudo, devido a vários condicionalismos internos e externos relativos ao comércio mundial da banana, a sua cultura na Região Autónoma da Madeira tem enfrentado algumas dificuldades. Como limitações internas, destacam-se a altitude e as temperaturas, os

acentuados declives, a pequena dimensão das explorações e a sua grande dispersão, as dificuldades de acesso e as dificuldades de mecanização que originam custos de produção elevados, quando comparados com outras regiões produtoras de banana, como por exemplo o Equador e o Brasil.

No sentido de aumentar a produtividade, têm sido aplicadas algumas medidas, como a melhoria da qualidade e o aumento da produção unitária, com o consequente aumento dos rendimentos do agricultor e redução dos custos de produção. De facto, nos últimos anos tem-se vindo a verificar uma estabilização na produção de banana, sendo a produção média actual de 20 500 toneladas (Figura 1.4).

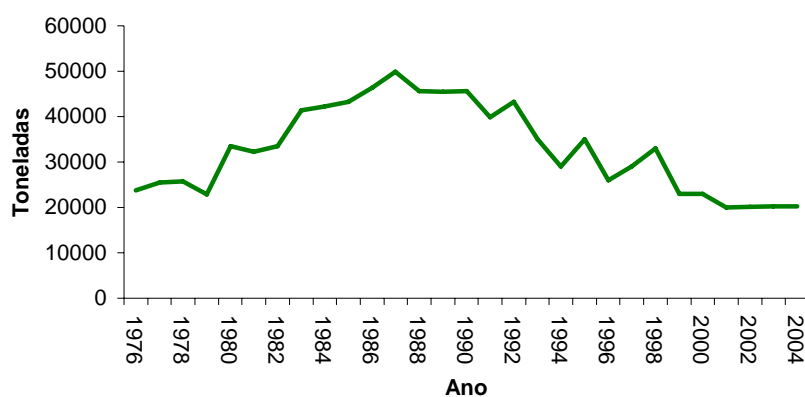


Figura 1.4. Valores estimados da evolução da produção de banana na RAM entre 1976 e 2004.

Grande parte da banana exportada e consumida localmente é produzida pela cultivar, regionalmente conhecida como “Pequena Anã” (*Musa acuminata* Colla, Grupo AAA, Subgrupo Cavendish), também conhecida por “Petite Naine” ou ‘Dwarf Cavendish’. Esta cultivar foi introduzida em meados do século XIX e é proveniente, provavelmente, de Demerara (Guiana) ou da vizinha Região Autónoma das Canárias. Esta é a variedade que melhor se adapta a solos medíocres e relativamente pouco profundos, que suporta melhor o vento e a mais cultivada nas zonas subtropicais [8,31].

Na RAM, a cultura da bananeira realiza-se sobretudo na vertente Sul, na faixa de terreno compreendida entre o nível do mar e aproximadamente os 300 metros de altitude (Figura 1.5). As zonas de produção estão estimadas em cerca de 1300 a 1500 hectares de bananeira.

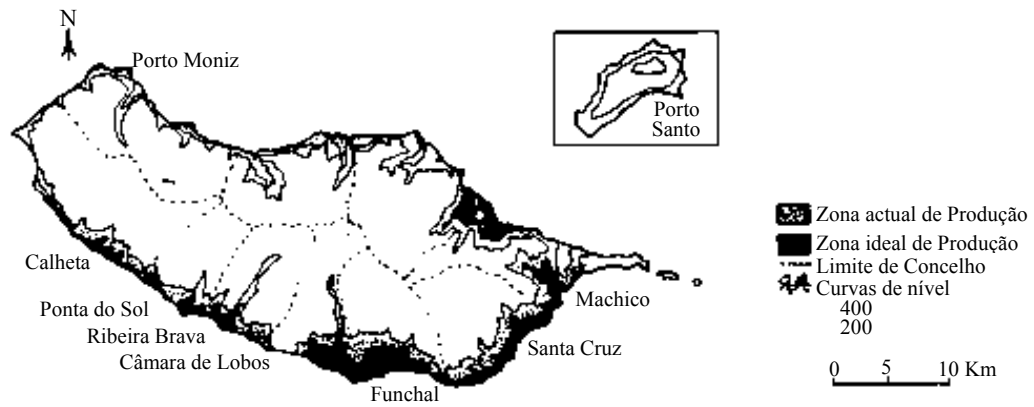


Figura 1.5. Mapa de distribuição da cultura da bananeira na Madeira em 1989 [31].

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. ESTRUTURA DA PAREDE CELULAR DAS PLANTAS

A parede celular é constituída por várias camadas, nomeadamente a lamela média, parede primária, parede secundária interior, média e externa e, parede terciária (Figura 2.1). Estas camadas diferem entre si no que diz respeito à sua estrutura bem como na sua composição química [33].

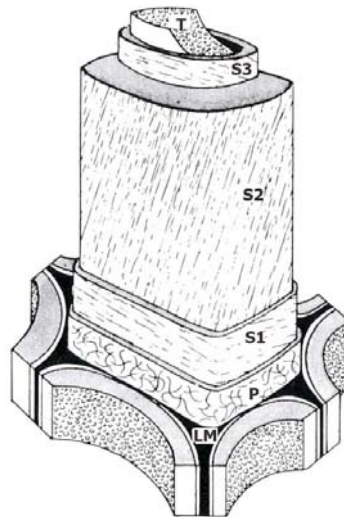


Figura 2.1. Representação esquemática de uma parede celular: LM. Lamela Média; P. Parede celular primária; S1, S2, S3. Parede celular secundária; T. Parede celular terciária [33].

A **lamela média** está localizada entre as células e tem como função ligar as células entre si. Numa fase inicial do crescimento é constituída maioritariamente por substâncias pécicas (10 a 30%), tornando-se altamente lenhificada com o aumento do estado de maturação da planta (70 a 90%) [33,34].

A **parede celular primária**, localizada na parte exterior da parede celular (Figura 2.1), é uma parede fina, constituída maioritariamente por lenhina (20 a 25% da lenhina total) e por menores quantidades de celulose, hemiceluloses, pectina e proteínas. A distinção entre a lamela média e a parede primária é por vezes difícil, adoptando-se o termo *lamela média composta* para o conjunto destas duas camadas. As microfibrilas de

celulose encontram-se dispostas de uma forma irregular na região exterior da parede primária, enquanto que na zona interna da camada, estão orientadas de forma transversal em relação ao eixo da célula [33,35]. No caso das monocotiledóneas, as hemiceluloses presentes na parede primária são maioritariamente xiloglucanas ou glucuronoarabinoxilanas [36].

A **parede celular secundária**, situada logo a seguir à parede primária, é constituída por três camadas, S_1 , S_2 e S_3 , que se distinguem estruturalmente pelo diferente alinhamento das fibrilas de celulose em relação ao eixo da célula (Figura 2.1). Contudo, as fibras de algumas monocotiledóneas, como por exemplo do bambú, podem apresentar quatro ou mais paredes secundárias. A parede secundária exterior (S_1) é a camada externa na qual as fibrilas de celulose estão orientadas em hélice Z (direita) ou em S (esquerda). Esta camada é constituída por cerca de 30 a 35% de celulose, 20 a 30% de hemiceluloses e 40 a 50% de lenhina. A parede secundária média (S_2) representa a maior fracção relativa da parede celular, tendo as suas características (espessura e ângulo fibrilar) um papel determinante na resistência das fibras. Esta camada é constituída por cerca de 50 a 55% de celulose, 30% de hemiceluloses e 15 a 20% de lenhina. A parede secundária interna (S_3) é uma parede fina constituída por microfibrilas de celulose orientadas quer em hélice Z quer em S. Quimicamente, a celulose nesta camada representa cerca de 55%, as hemiceluloses 30 a 40% e a lenhina 5 a 10% do seu conteúdo total [33-35].

A camada situada na zona mais interna da célula, a **parede celular terciária** (camada rugosa), caracteriza-se por ser uma membrana amorfa, de espessura muito fina que envolve o lúmen da célula e na qual as microfibrilas estão dispostas com alguma inclinação em relação ao eixo da fibra e não são completamente paralelas. Esta parede é constituída por uma quantidade elevada de substâncias não-estruturais, que consistem maioritariamente em compostos polifenólicos semelhantes à lenhina, e alguma quantidade de hidratos de carbono e substâncias pécicas [35,37].

2.2. ESTRUTURA ANATÔMICA

A nível microscópico, as plantas possuem uma estrutura complexa, diferindo entre si pelo número e tipo de células que possuem. À semelhança das outras plantas monocotiledóneas, as várias partes morfológicas da bananeira apresentam uma estrutura anatômica distinta, possuindo cada uma delas elementos morfológicos característicos, consoante a função que desempenham.

Os estudos anatómicos das várias partes morfológicas da bananeira são escassos, em particular da variedade ‘Dwarf Cavendish’, para a qual foram encontrados apenas dados anatómicos sobre o ráquis [2,38]. Relativamente às restantes partes morfológicas da bananeira, com excepção das bainhas foliares e do ráquis, dado que não foi encontrado na literatura informação acerca da sua estrutura anatômica, optou-se por descrever a estrutura típica das monocotiledóneas em geral.

2.2.1. FOLHAS

Dadas as funções de fotossíntese, respiração e transpiração das folhas, na sua secção transversal é possível observar três regiões distintas: a epiderme, o mesófilo e os feixes vasculares (Figura 2.2).

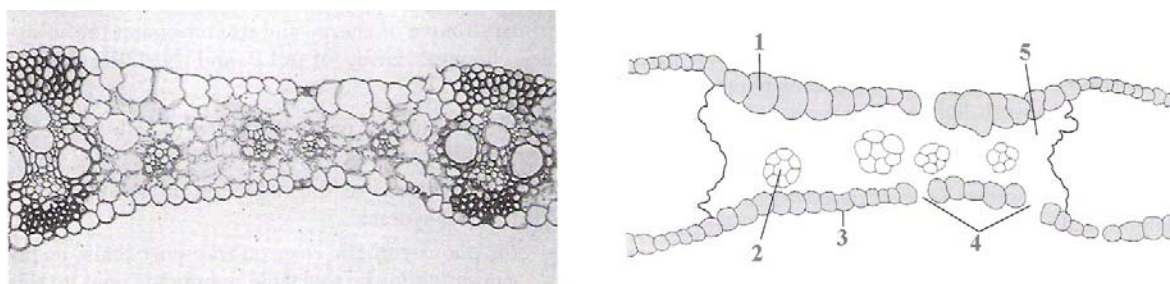


Figura 2.2. Esquema de uma secção transversal de uma folha da monocotiledónea *Zea mays*: (1) Epiderme, (2) Feixe vascular, (3) Epiderme, (4) Estomas e (5) Células mesófilas [39].

A *epiderme* consiste num tecido de revestimento (epiderme superior e inferior) que tem como função proteger os tecidos internos e controlar a perda de água, encontrando-se revestida na sua superfície por uma membrana extracelular de lípidos polimerizados e solúveis designada por cutícula. A estrutura e a composição da cutícula variam largamente entre plantas, órgãos e estágios de crescimento, sendo basicamente constituída por uma matriz de cutina com ceras intracuticulares e epicuticulares [40]. Na epiderme é possível

observar a existência de poros (estomas) que permitem a troca de dióxido de carbono e de oxigénio entre a folha e o exterior. O tecido fotossintético que se encontra localizado entre as duas camadas de epiderme constitui o *tecido mesófilo*, o qual é constituído por células de parênquima que contêm os cloroplastos. Os *feixes vasculares* desempenham funções de transporte de água e nutrientes que são efectuadas pelas células de xilema e floema constituintes do tecido vascular [39].

2.2.2. PSEUDO-TRONCO

Bainhas Foliaves

As fibras das bainhas foliaves consistem essencialmente em fibras multicelulares, constituídas por quatro tipos de células: xilema, floema, esclerênquima e parênquima, dispostas de uma forma particular. A forma das células varia desde circular a poligonal de bordos arredondados ou circulares a elípticos (Figura 2.3) [41].

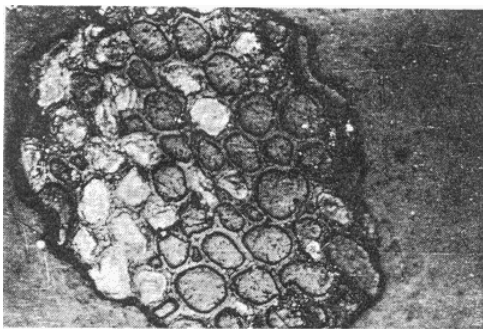


Figura 2.3. Secção transversal de uma fibra de bananeira extraída das bainhas foliaves da *Musa sapientum*. A fibra é multicelular com paredes celulares delgadas e lúmen grande ($\times 320$) [41].

As células das fibras das bainhas foliaves do pseudo-tronco da *Musa sapientum* apresentam em geral um diâmetro de 18-30 μm , com uma parede celular aparentemente fina (*ca.* 1,25 μm) e uniforme. À semelhança de outras fibras vegetais, a celulose cristalina das fibras de bananeira de diâmetro de 100 a 200 μm , encontra-se na forma de uma hélice com um ângulo de 11 a 12° [41].

Talo Floral

O talo floral em geral tem como funções principais o transporte e armazenamento de nutrientes bem como de suporte, sendo possível observar na sua secção transversal três regiões distintas: a epiderme, o tecido principal e os feixes fibro-vasculares. Os tecidos vasculares encontram-se revestidos por fibras esclerênquima, as quais para além de

protegerem os feixes vasculares dão rigidez ao talo. No caso particular das bananeiras, o tecido principal é constituído maioritariamente por células parênquima, ricas em grãos de amido [7,36].

2.2.3. RÁQUIS

De uma forma idêntica ao talo floral, os cortes histológicos do ráquis da ‘Dwarf Cavendish’ mostram que os seus tecidos são constituídos por vários tipos de células: *i*) células parênquima, que formam o tecido principal; *ii*) feixes fibro-vasculares e *iii*) vasos.

Na sua secção transversal (Figura 2.4), a sua estrutura é caracterizada por numerosos feixes fibro-vasculares envolvidos por células parênquima. O tecido parenquimatoso é mais abundante nas camadas mais internas do ráquis, diminuindo gradativamente em direcção à periferia. As células estão dispostas no sentido longitudinal, não possuindo células dispostas no sentido radial, como no caso das plantas dicotiledóneas e gimnospermicas. Os tricomas da epiderme são do tipo unicelular e de diferentes tamanhos.

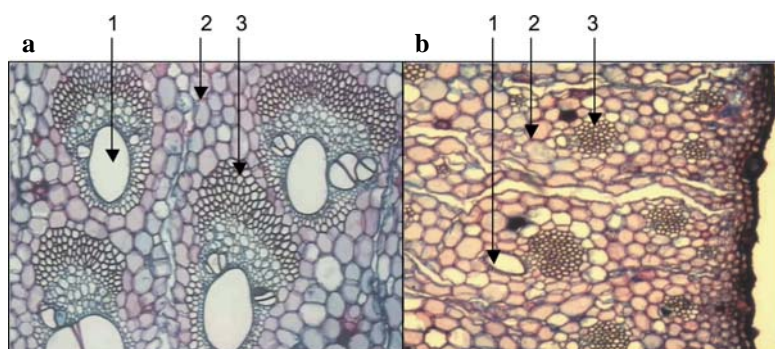


Figura 2.4. Plano transversal do centro (a) e periferia (b) do ráquis da bananeira ‘Dwarf Cavendish’. (1) vasos, (2) células de parênquima e (3) feixes fibrosos ($\times 100$) [2].

No caso da ‘Dwarf Cavendish’, 23,9% do ráquis são fibras, enquanto que 6,5% correspondem a vasos e 69,6% a células parênquima. As células das fibras do ráquis desta variedade apresentam em média um diâmetro de lúmen de $30,6\ \mu\text{m}$, e uma espessura de parede celular de $3,8\ \mu\text{m}$ [2,38].

2.3. CONSTITUINTES QUÍMICOS DAS PLANTAS

A composição química dos materiais lenhocelulósicos está intimamente relacionada com as necessidades particulares das plantas, sendo a celulose, as hemiceluloses e a lenhina os três constituintes maioritários de qualquer fonte lenhocelulósica. Outros componentes existentes, mas em menor abundância, são o amido, as pectinas, os compostos orgânicos de baixo peso molecular (extractáveis) e o material inorgânico (cinzas).

2.3.1. COMPOSIÇÃO QUÍMICA

Apesar de existirem alguns estudos relacionados com a composição química das bainhas foliares e do ráquis da bananeira (Tabela 2.1) [2,5,21-23,38,42] o conhecimento acerca da abundância e estrutura dos constituintes das várias partes morfológicas da bananeira é relativamente escasso.

Tendo em conta a natureza fibrosa do pseudo-tronco (ca. de 24-31%) [15,24] e do ráquis, na Tabela 2.1 é apresentada a composição química obtida por vários autores, quer para o material bruto quer para as respectivas fibras.

Tabela 2.1. Composição química do material bruto e fibras extraídas do pseudo-tronco e do ráquis de várias variedades de *Musa acuminata* Colla (%).

Componente	Pseudo-tronco		Ráquis	
	Material Bruto [21]	Fibras [5]	Material Bruto [2,38]	Fibras [42]
Cinzas	13,9	4,7	22,8	14,0
Extractáveis	14,1	—	44,1-47,0	10,2
Lenhina	12,0	5-10	7,4-8,7	11,7
Holocelulose	60,1	66-73	45,6	67,0
Celulose	34,5	60-65	—	56,1

Os teores dos vários componentes no material bruto e nas fibras do pseudo-tronco e do ráquis são próximos dos apresentados por outras plantas monocotiledóneas [43-45].

Contudo, as plantas monocotiledóneas apresentam em geral uma percentagem de lenhina inferior (8-22%) [43-45] relativamente às madeiras de folhosas e resinosas (20-

32%) [33] e de material inorgânico (3-20%) [44,45] muito superior ao apresentado pela maioria das madeiras (0,1-3,5%) (Tabela 2.1) [46].

Uma outra particularidade das monocotiledóneas, é a presença de elevados teores de sílica (SiO_2), os quais variam, no caso das gramíneas, entre 0,5 a 3,4%. Para além do silício, outros elementos importantes na composição deste tipo de plantas são o cálcio e o fósforo [45].

No caso da bananeira, a abundância dos diferentes elementos minerais varia consoante a região morfológica em estudo, sendo de destacar o elevado teor de potássio presente no pseudo-tronco (Tabela 2.2) [11,24].

Tabela 2.2. Composição mineral das cinzas das folhas e do pseudo-tronco de diferentes espécies de *Musa* [11,24,47].

Amostra	% Cinzas	% P	% Ca	% Mg	% I	% K	% Na	% Fe
Folhas	6,8	6,4	0,73	0,24	0,21	0,04	0,002	0,003
Pseudo-tronco	11,6-13,1	0,05-0,9	0,7-1,5	0,8	—	3,8-5,1	0,02	0,005-0,05

É de referir que uma característica das plantas anuais é o da sua anatomia se alterar rapidamente durante o seu crescimento, o que se reflecte numa alteração da composição química global da planta à medida que a composição química das várias partes anatómicas difere [45].

2.3.2. EXTRACTÁVEIS

O termo “*extractáveis*” é usado para designar uma variedade de compostos orgânicos que podem ser extraídos da biomassa vegetal por vários solventes. Estes compostos podem ser divididos em duas grandes classes: os extractáveis solúveis em solventes orgânicos e os extractáveis solúveis em água.

Os extractáveis concentram-se maioritariamente nos canais resinosos e nas células parênquima, dependendo o seu teor e composição de factores como a espécie, a região morfológica, a idade e a origem da planta.

De acordo com as suas características estruturais, estes compostos podem ser classificados em diferentes classes, das quais os compostos lipofílicos (compostos alifáticos, terpenos e terpenóides) e os compostos fenólicos [48,49] são em geral os mais importantes.

2.3.3. EXTRACTÁVEIS LIPOFÍLICOS

2.3.3.1. COMPOSTOS ALIFÁTICOS

Neste grupo de compostos estão principalmente incluídos os alcanos, os álcoois e os ácidos gordos livres ou esterificados (Figura 2.5).

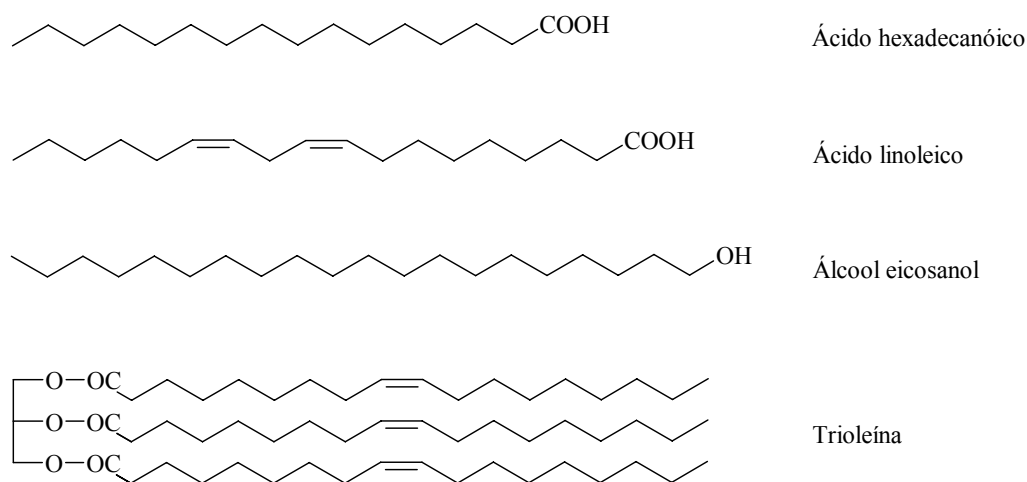


Figura 2.5. Estruturas de alguns dos compostos alifáticos mais comuns.

Os ácidos gordos mais abundantes na biomassa vegetal são em geral os ácidos palmítico, linoleico, linolénico e oleico [48,49]. Os ácidos gordos encontram-se na sua maioria sob a forma de ésteres, sendo os mais importantes os ésteres de glicerol (nomeadamente os triglicéridos) e os ésteres de esterilo.

Os álcoois quando esterificados constituem as chamadas ceras, que estão presentes nas cutículas das partes aéreas das plantas.

2.3.3.2. TERPENOS E TERPENÓIDES

Os terpenos podem ser considerados como produtos resultantes da condensação de duas ou mais unidades de isopreno (2-metilbutadieno). Dependendo do número de unidades de isopreno, os terpenos podem ser divididos em várias classes: monoterpenos (2 unidades), sesquiterpenos (3 unidades), diterpenos (4 unidades), sesterterpenos (5 unidades), triterpenos (6 unidades), tetraterpenos (8 unidades) e politerpenos (>8 unidades). Os terpenos que contêm grupos funcionais específicos (como por exemplo

grupos hidroxilo, carbonilo, carboxilo e funções éster) são designados por terpenóides [48,49].

Os *monoterpenos* podem ser subdivididos em compostos acíclicos, monocíclicos e bicíclicos [48,49] e assim, como os *sesquiterpenos*, encontram-se em grande abundância nos óleos voláteis de certas plantas. Alguns destes compostos, além de serem responsáveis pelo odor e perfume das mesmas, são também conhecidos pelas suas propriedades repelentes de insectos [50].

Da análise dos compostos voláteis do pseudo-tronco da bananeira (cultivar “githumo”) foram detectados diversos compostos entre os quais se destacam vários *monoterpenos* (α -pineno, β -pineno, β -mirceno, limoneno e 1,8-cineole) e *sesquiterpenos* (α -cubebeno, α -copaeno, α -cedreno, β -cariofileno e α -humuleno) (Figura 2.6) [51,52].

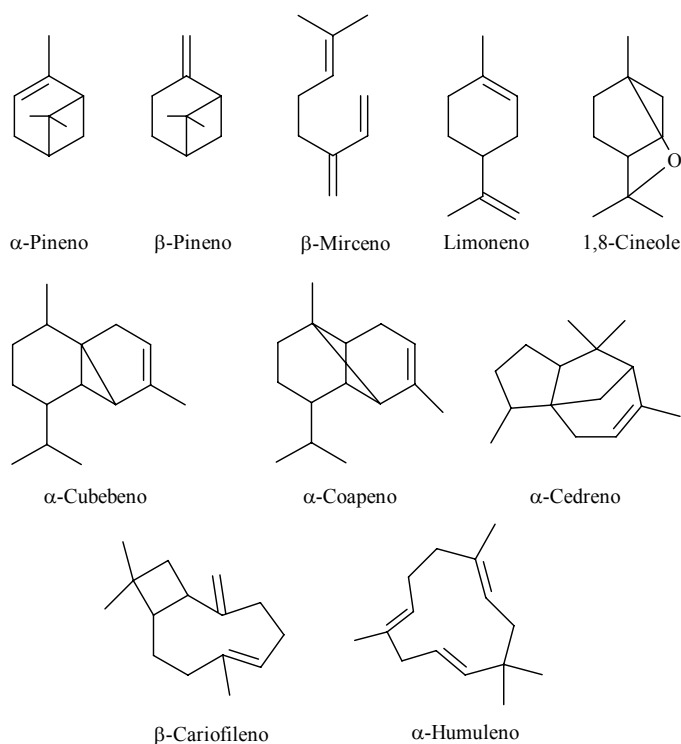


Figura 2.6. Monoterpenos e sesquiterpenos identificados no pseudo-tronco da cultivar “githumo” [51,52].

De entre os compostos presentes no pseudo-tronco de várias cultivares de bananeira, nomeadamente da ‘Dwarf Cavendish’, o 1,8-cineole foi identificado como um dos componentes activos e atractivos do gorgulho *Cosmopolites sordidus*, o qual constitui a

praga de insectos que mais afecta as cultivares de bananeira existentes em todas as regiões produtoras de banana [52].

Os *triterpenóides* pertencem a um dos grupos de compostos naturais mais abundantes, no qual estão incluídos os esteróis, os esteróides e as saponinas.

Embora a maioria dos triterpenóides sejam tetracíclicos e pentacíclicos, estes também ocorrem na natureza como acíclicos, monocíclicos, bicíclicos, tricíclicos e hexacíclicos [53].

Os *esteróis* são compostos constituídos por um sistema tetracíclico, característico dos esteróides. Os esteróis existentes nas plantas (fitoesteróis) possuem um oxigénio (em geral um grupo hidroxilo) na posição C₃ e uma cadeia lateral de comprimento variável em C₁₇, podendo apresentar ligações duplas e grupos metilo em diversas posições [54-56].

Os fitoesteróis podem ser divididos em: 4-desmetil esteróis, 4-metil esteróis e 4,4-dimetil esteróis. Os 4-desmetil esteróis são os mais abundantes e podem ser agrupados em Δ^5 -esteróis, Δ^7 -esteróis e $\Delta^{5,7}$ -esteróis (Figura 2.7) dependendo da posição e do número de ligações duplas existentes [55].

A maioria dos fitoesteróis apresenta uma cadeia carbonada de 27-30 carbonos, sendo o β -sitosterol, o fitoesterol mais abundante nos tecidos vegetais. Outros esteróis comuns são o campesterol, o estigmasterol, o citrostadienol e o ergosterol (Figura 2.7) [49,54].

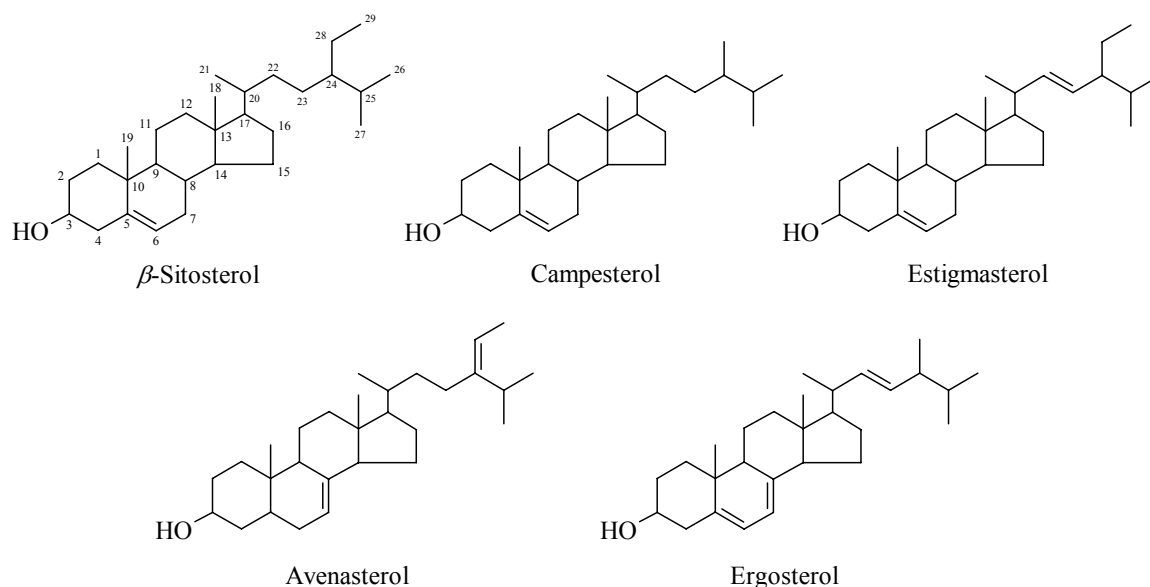


Figura 2.7. Exemplos de 4-desmetil esteróis (Δ^5 , Δ^7 e $\Delta^{5,7}$) mais comuns das plantas.

Para além da sua forma livre, os esteróis podem ocorrer nas plantas na forma esterificada com ácidos gordos ou ácidos fenólicos, na forma de glucosídeos de esterilo e acil-glucosídeos de esterilo (Figura 2.8) [55,57].

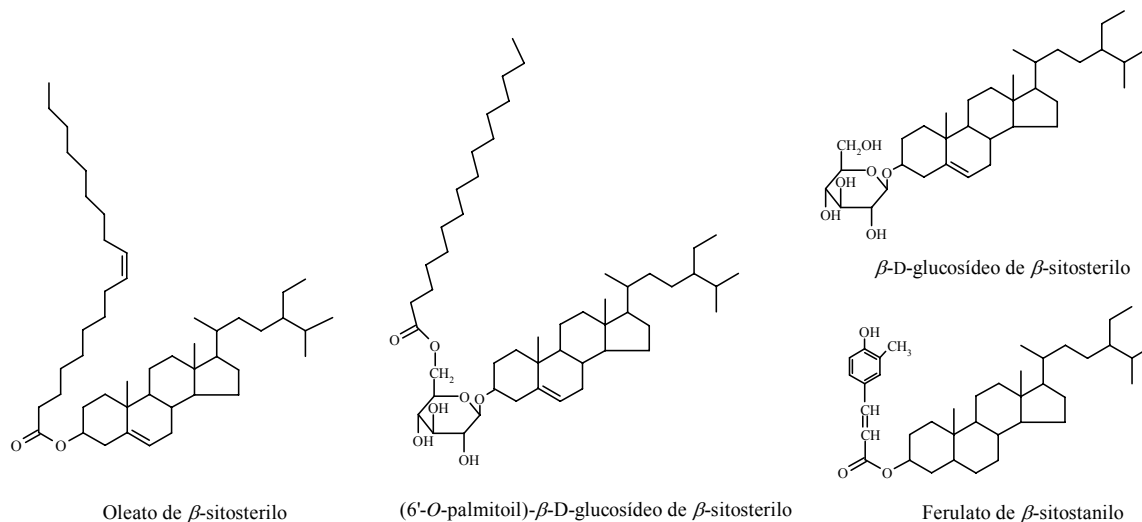


Figura 2.8. Exemplos de esteróis conjugados existentes nas plantas [55].

Em diferentes partes da *Musa sapientum* (casca e polpa da banana, talo floral, rizoma e folhas) foram identificados vários esteróis e ésteres de esterilo (Figura 2.9). O cicloeucalenol, o cicloartenol e o 24-metilenocicloartanol foram encontrados nas formas livre e esterificada (como ésteres do ácido palmítico), enquanto que o estigmasterol, o campesterol e o β-sitosterol foram encontrados somente na sua forma livre [58-60]. Uma cetona derivada de um 4α-metilesterol, identificada mais tarde pelos mesmos autores, como sendo a 31-norciclolaudenona [61], foi detectada em grandes quantidades no talo floral, no rizoma e na casca, sendo contudo um componente minoritário da polpa e das folhas. Contrariamente às restantes regiões, nas folhas não foram detectados esteróis esterificados, apresentando contudo grandes quantidades de hidrocarbonetos [58].

Da casca da banana da *Musa sapientum* para além dos referidos anteriormente, foram isolados muitos outros esteróis, entre os quais a cicloeucalenona, o ciclolaudenol, o 24-metilenopolinastanol, o isofucoesterol e o obtusifoliol (Figura 2.9) [59,62,63].

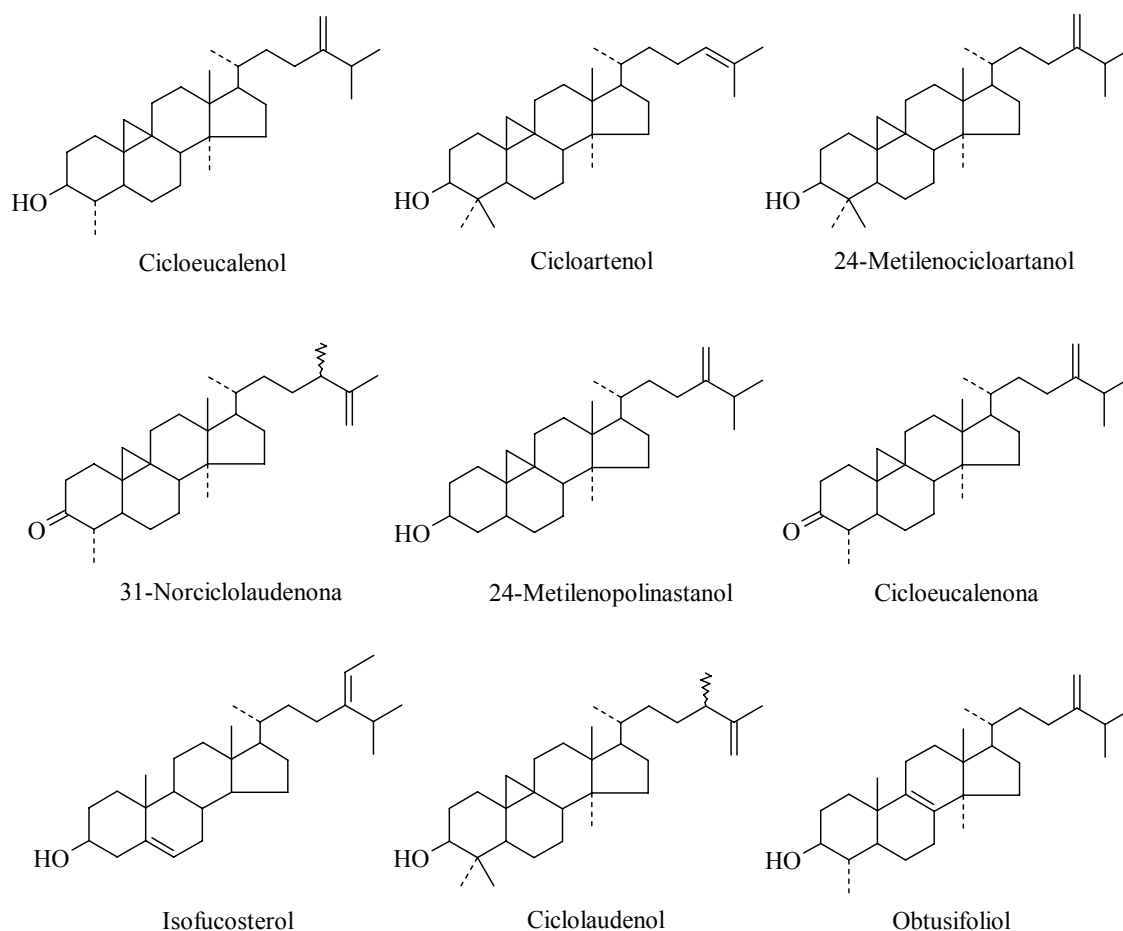


Figura 2.9. Exemplos de alguns esteróis identificados em várias partes da *Musa sapientum* [59,62,63].

Nas flores da *Musa paradisiaca*, para além dos esteróis previamente referidos (cicloeucalenol, 24-metilenocicloartanol, 31-norciclolaudenona, β -sitosterol e estigmasterol), foram detectados dois novos compostos (Figura 2.10): a 4 α ,14 α -dimetil-9,19-ciclocolestano-20-en-3-ona (**a**) [64] e o (24R)-4 α ,14 α ,24-trimetil-5 α -colesta-8,25(27)-dien-3 β -ol (**b**) [65].

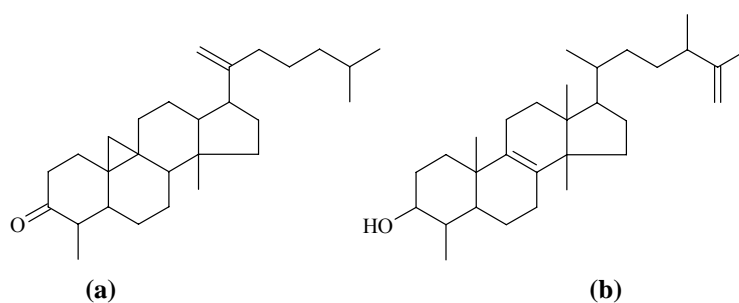


Figura 2.10. Estrutura da cetona triterpénica (a) e do triterpenóide tetracíclico (b) identificados nas flores da *Musa paradisiaca* [64,65].

No fruto da *Musa paradisiaca*, conhecido pelas suas propriedades anti-ulcerogénicas, foram detectados vários glucosídeos de esterilo e acil-glucosídeos de esterilo (Figura 2.11) que mostraram ser os princípios activos responsáveis pelas propriedades medicinais apresentadas pelo fruto desta espécie de *Musa* [66,67].

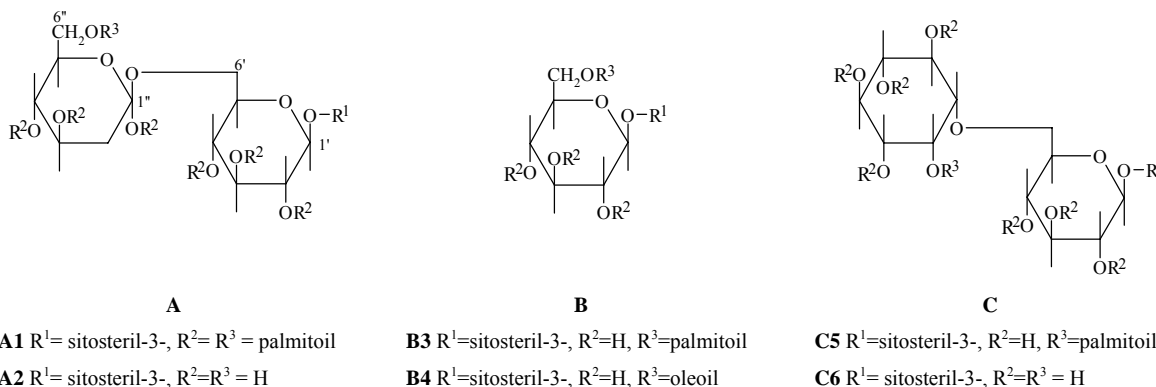


Figura 2.11. Estruturas de glucosídeos de esterilo e acil-glucosídeos de esterilo identificados no fruto da *Musa paradisiaca* [66,67].

2.3.3.3. COMPOSTOS FENÓLICOS

A designação “compostos fenólicos” abrange um vasto grupo de substâncias orgânicas que consistem em compostos aromáticos com substituintes hidroxilo [68]. As substâncias fenólicas, presentes na maioria dos tecidos vegetais, possuem propriedades fungicidas, pelo que desempenham um papel fundamental na protecção das plantas de ataques microbiológicos [48,68].

Os extractáveis fenólicos são constituídos por uma classe heterogénea de compostos, entre os quais se destacam os ácidos fenólicos, os flavonóides e os taninos (Figuras 2.12 a 2.15).

Os *ácidos fenólicos* nas plantas encontram-se na sua maioria ligados covalentemente a outros componentes estruturais das plantas, sendo detectados em quantidades vestigiais na sua forma livre [69]. De entre os ácidos fenólicos (C_6-C_1), os ácidos vanílico e sirínico, assim como os aldeídos correspondentes, encontram-se na maioria das plantas, embora em concentrações relativamente baixas.

A classe maioritária dos compostos fenólicos é a correspondente aos ácidos hidroxicinâmicos (C_6-C_3), na qual os ácidos cafeico, ferúlico e *p*-cumárico são os elementos mais comuns (Figura 2.12). Os ácidos ferúlico e *p*-cumárico estão presentes nas

paredes celulares das plantas gramíneas, predominantemente nas formas esterificada e eterificada [70,71].

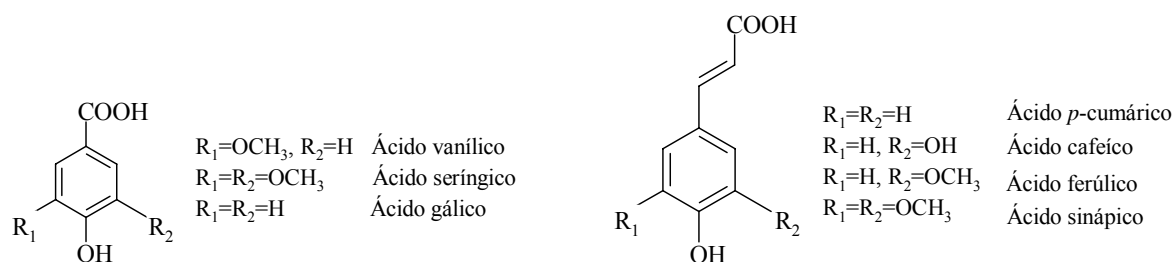


Figura 2.12. Estruturas de alguns ácidos fenólicos.

De entre os polifenóis vegetais, os **flavonóides** são o grupo mais abundante. Estes compostos são constituídos por um esqueleto de carbono $C_6C_3C_6$ e, podem ser divididos em várias classes de acordo com o grau de oxidação do oxigénio heterocíclico [68,70].

Uma subclasse importante dos flavonóides são as antocianinas, as quais constituem um grupo de pigmentos intensivamente coloridos que são responsáveis pelas cores laranja, vermelha, púrpura e azul de muitos frutos, vegetais, flores, folhas e raízes das plantas. Estes polifenóis consistem fundamentalmente em antocianidinas glicosídicas, as quais também podem ocorrer na forma de acil-glicosídeos [68,72,73]. As antocianidinas mais comuns e geralmente encontradas nas plantas são a cianidina, a pelargonidina, a peonidina, a delphinidina, a petunidina e a malvidina (Figura 2.13).

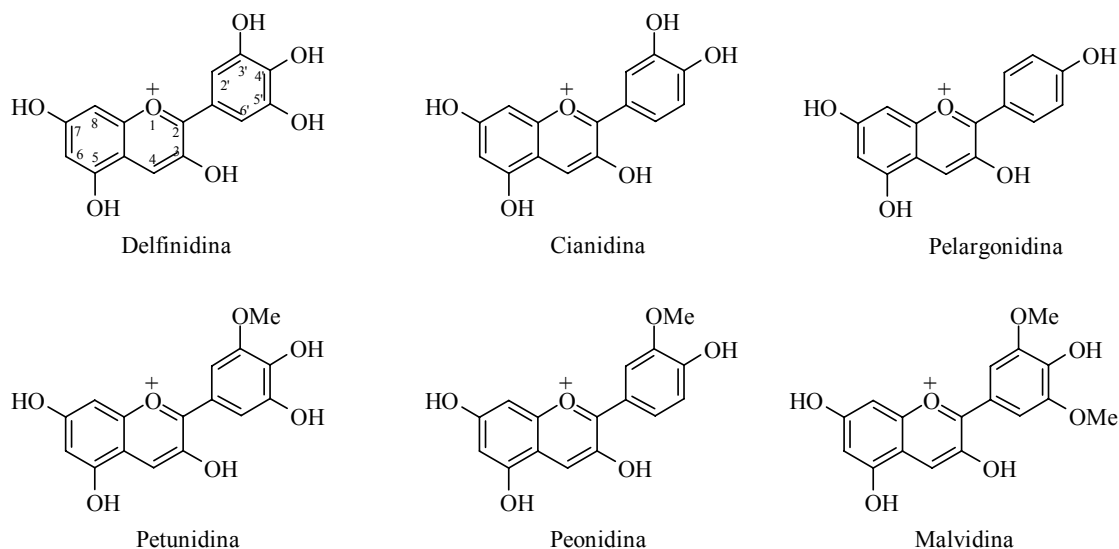


Figura 2.13. Antocianidinas mais comuns existentes na natureza [73].

A combinação destas antocianidinas com a natureza, número e posição dos açúcares ligados, assim como com a natureza e número de ácidos alifáticos ou aromáticos que podem estar ligados aos açúcares, explica a existência de uma grande variedade de antocianinas.

A análise das brácteas de várias espécies de *Musa* revelou a presença das seis antocianidinas que se encontram vulgarmente na natureza (Figura 2.13). Estes pigmentos ocorrem essencialmente sob a forma glicosídica, como é o caso dos derivados 3-rutinosídeos da cianidina, da delphinidina, da peonidina, da petunidina e da malvidina detectados nas brácteas da *Musa acuminata* [30,68].

Consoante a espécie de bananeira, as brácteas existentes no pinguelo, podem apresentar cores diferentes como vermelho, púrpura, violeta, verde ou amarelo. Esta variação de cor, que está relacionada com a composição de antocianinas, é distinta de espécie para espécie, tendo sido a química das antocianinas usada inclusivé como ferramenta taxonómica na diferenciação de espécies [6].

Nas sementes da *Musa sapientum*, para além da presença de glicosídeos de leucoantocianidina e proantocianidina [74], foram identificados quatro novos 3,4-flavanodióis (Figura 2.14) [75].

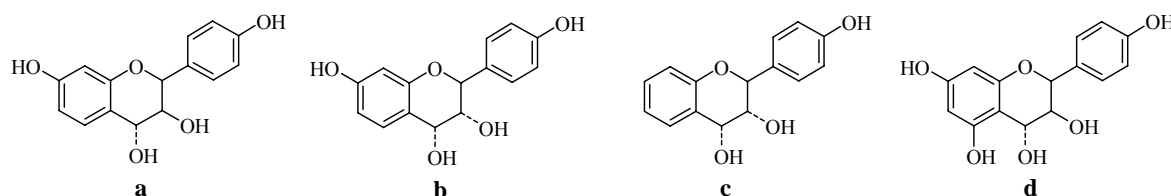


Figura 2.14. Estruturas dos 3,4-flavanodióis identificados nas sementes da *Musa sapientum* [75].

Os *taninos* correspondem a uma família de produtos naturais muito abundante, que pode ser dividida em dois grupos: *i*) os *taninos hidrolisáveis*, constituídos por ésteres de glucosídeos de ácidos fenólicos, os quais após hidrólise originam como produtos principais os ácidos gálico e elágico e açúcares, em geral, a glucose; e *ii*) os *taninos condensados*, formados por policondensação dos flavonóides catequina (3-flavanol) e leucoantocianidina (3,4-flavanodiol) (Figura 2.15) [76].

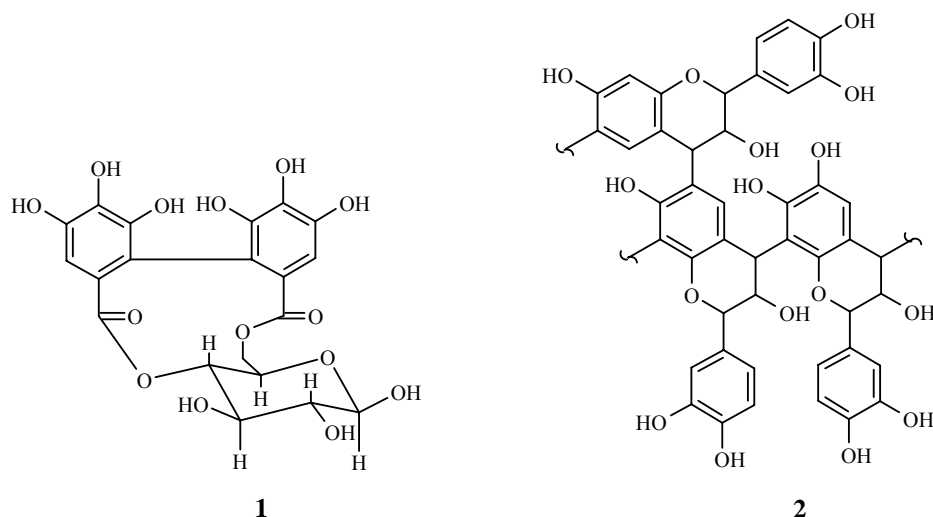


Figura 2.15. Exemplos de um tanino hidrolisável (elagitanino) (1) e condensado (2).

Baijal e outros [77] quantificaram os compostos fenólicos, em termos de ácido tânico, em diferentes órgãos da *Musa paradisiaca*. Esta quantificação evidenciou que estes compostos estão largamente concentrados nos limbos, seguidos dos frutos e do rizoma, enquanto que as bainhas foliares, assim como as partes superior e inferior do pseudotrunko, apresentaram as menores concentrações de substâncias fenólicas.

2.3.4. CUTINA E SUBERINA

Como mecanismo de protecção contra a perda de água e nutrientes bem como a infecção por organismos patogénicos, as plantas desenvolveram tecidos superficiais especializados que cobrem todas as superfícies aéreas e os órgãos subterrâneos. Estes tecidos são caracterizados por possuírem quantidades substanciais de dois biopolímeros alifáticos apoplásticos, a cutina e a suberina, respectivamente [78].

A cutina juntamente com as ceras encontra-se no exterior da parede celular da epiderme das partes aéreas das plantas, a cutícula. As cutículas são deste modo quimicamente heterogêneas, consistindo numa fracção de cera solúvel em solventes orgânicos e, numa matriz cuticular maioritária insolúvel, a cutina [79]. A cutina é um biopoliéster amorfo constituído maioritariamente por hidroxiácidos de cadeia carbonada C16 e C18. Os ácidos hexadecanóico, ω -hidroxihexadecanóico e 10,16-di-hidroxihexadecanóico e/ou os seus isómeros posicionais, nos quais o grupo hidroxilo se encontra em C9, C8 ou C7 são os componentes dominantes da cutina das plantas de crescimento rápido [40,80,81]. A Figura 2.16 apresenta um modelo estrutural proposto para a cutina

[81]. Neste modelo, a estrutura da cutina mantém-se unida predominantemente através das ligações éster dos álcoois primários, sendo a esterificação dos álcoois secundários responsável pela formação de ramificações e/ou formação de ligações cruzadas no polímero [81,82].

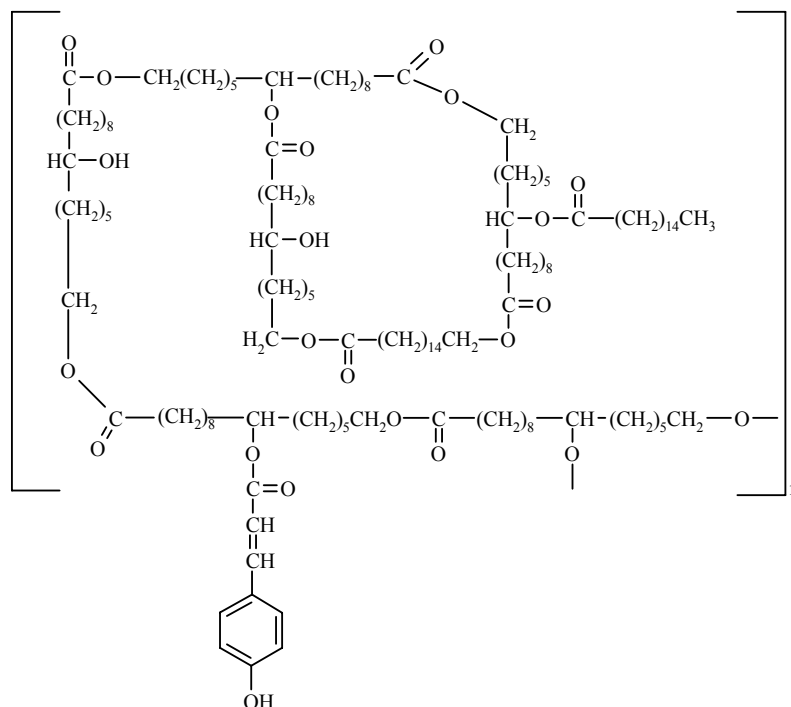


Figura 2.16. Modelo proposto por Kolattukudy [81] indicativo do tipo de estruturas presentes numa cutina contendo como monómeros maioritários os da família C16.

Além dos ácidos gordos, estudos efectuados em algumas plantas indicam que a cutina possui uma percentagem minoritária de ácidos fenólicos esterificados, na qual, o ácido *p*-cumárico surge como componente maioritário em quase todas as cutinas estudadas. O ácido ferúlico, por sua vez, foi identificado apenas nas cutinas de algumas plantas [81].

A suberina, que se encontra em geral nas partes subterrâneas das plantas (p.e. epiderme, endodermis, exodermis), é um biopolímero mais complexo que a cutina. É composto por uma fracção alifática e outra aromática, em que a última é constituída por ácidos hidroxicinâmicos tais como os ácidos *p*-cumárico, cafeico e em especial pelo ácido ferúlico, que se encontram, presumivelmente, envolvidos na ligação entre a fracção alifática e os polissacarídeos da parede celular. A fracção alifática da suberina é um

poliéster constituído principalmente por ω -hidroxiácidos e α,ω -diácidos de cadeia longa (C_{16} a C_{32}) [78, 83,84]. Dado que a presença de α,ω -diácidos assim como de ácidos gordos de cadeia muito longa ($>C_{18}$) na cutina é minoritária, estes dois factores permitem diferenciar os tecidos cutinizados dos suberizados [85].

O estudo das ceras epicuticulares totais das folhas, tronco, brácteas e fruto de diferentes variedades de bananeira, incluindo a ‘Dwarf Cavendish’, evidenciou que os constituintes predominantes dessas ceras foram álcoois primários, ácidos gordos, ésteres, cetonas e aldeídos. Enquanto que os constituintes predominantes das ceras das folhas foram álcoois primários e ácidos gordos, nas brácteas e nos frutos, os ésteres e os ácidos gordos foram os compostos maioritários. As restantes famílias encontraram-se presentes em quantidades vestigiais, com excepção do fruto, que apresentou maiores quantidades de cetonas e aldeídos que as folhas e as brácteas. A composição da cera extraída do tronco das plantas apresentou-se muito semelhante à dos frutos [86].

2.3.5. POLISSACARÍDEOS

Os polissacarídeos são moléculas complexas constituídas por um grande número de monossacarídeos unidos por ligações glicosídicas. A sua cadeia molecular pode ser linear ou ramificada, o que influencia de uma forma acentuada as propriedades físicas dos polissacarídeos. Os polissacarídeos mais abundantes nas plantas são a celulose, o amido e as hemiceluloses.

A celulose e as hemiceluloses têm funções de suporte nas paredes celulares das plantas enquanto que o amido é o polissacarídeo de armazenamento dominante das plantas superiores [87].

2.3.5.1. Celulose

A celulose é o composto orgânico natural mais abundante e disponível na biomassa vegetal, sendo a fonte de mais de 40% de todo o carbono orgânico disponível. É um polímero linear constituído por unidades de β -D-glucopirranose unidas por ligações glicosídicas $\beta(1 \rightarrow 4)$ (Figura 2.17). Na cadeia de celulose a unidade repetitiva é a celobiose [88,89].

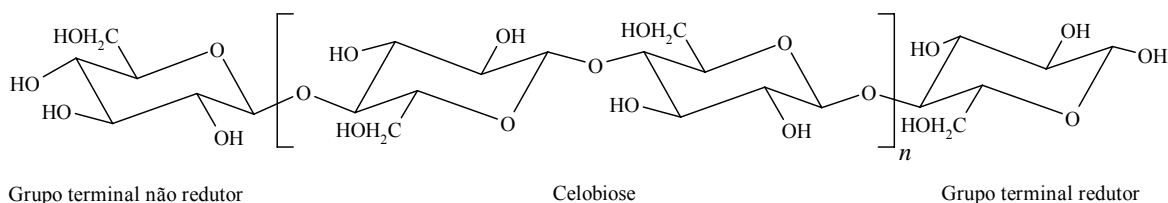


Figura 2.17. Estrutura de uma cadeia de celulose.

As propriedades da celulose são influenciadas pelo valor do seu grau de polimerização, podendo definir-se na prática três tipos de celulose, em função desse valor: i) α -celulose. Caracteriza-se por um elevado grau de polimerização que varia entre 200 e 3000 unidades de celobiose e por ser insolúvel em meio alcalino. ii) β -celulose. Celulose de cadeias mais curtas, solúvel em meio alcalino e precipitável após a neutralização da solução. O seu grau de polimerização não excede as 50 unidades de celobiose. iii) γ -celulose. Trata-se de uma fracção de celulose com baixo grau de polimerização (com cerca de 15 unidades de celobiose) que permanece solúvel na solução neutralizada [34,89].

Estrutura supramolecular da celulose

A presença dos grupos OH livres nas moléculas de celulose fazem com que as unidades de glucose apresentem uma forte tendência para formar ligações de hidrogénio intra ($O3-H \cdots O5'$ e $O6 \cdots H-O2'$) e intermoleculares ($O6-H \cdots O3$), bem como forças de Van der Waals. Estas ligações são responsáveis pela rigidez de cada cadeia e pela formação de estruturas primárias organizadas, fibrilas elementares, que possuem regiões altamente organizadas (cristalinas) alternadas com regiões menos organizadas (amorfas) [88,89].

A celulose nativa, designada em termos cristalográficos por Celulose I, obedece a um modelo de célula unitária monoclinica no qual a célula unitária é constituída por 4 resíduos de glucose e apresenta uma estrutura cristalina como a exemplificada na Figura 2.18(a) [90].

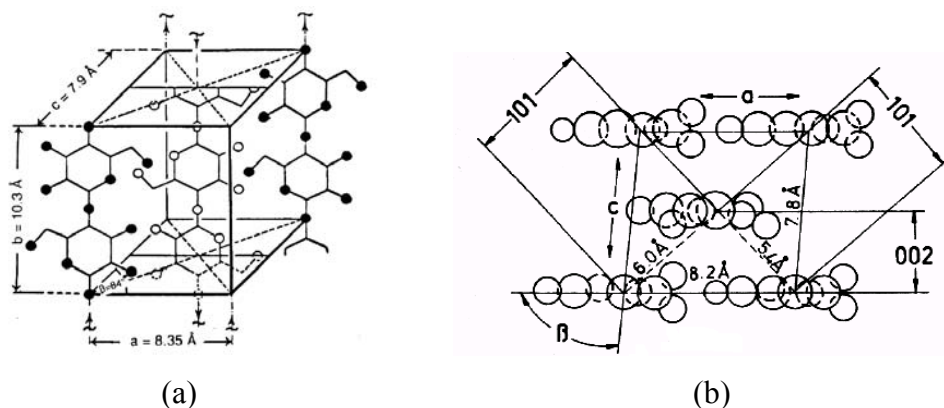


Figura 2.18. Célula unitária da celulose I (a) e planos da célula unitária da celulose I (b) [90].

A celulose pode, no entanto, adotar outras estruturas polimórficas com alteração das dimensões dos eixos a e c e dos ângulos entre eles, mantendo, contudo, para qualquer uma das modificações cristalinas, $b=1.03\text{nm}$ segundo o eixo ao longo da fibra:

- celulose II, quando é precipitada de uma solução aquosa com solventes apropriados ou quando é sujeita a soluções fortemente alcalinas. A celulose II tem uma maior densidade de pontes de hidrogénio inter-moleculares, devido à disposição das cadeias na célula unitária, e é termodinamicamente mais estável, pelo que a passagem de celulose I a II é praticamente irreversível.
- celulose III, quando a celulose I ou II é tratada com uma solução de amónia, monometilamina ou monoetilamina, a temperaturas acima dos -30°C e posteriormente recristalizada por evaporação da amónia.
- celulose IV, quando a celulose I ou II é tratada com glicerina a alta temperatura sob pressão [90,91].

2.3.5.2. Hemiceluloses

Contrariamente à celulose, as hemiceluloses são heteropolímeros que possuem uma estrutura geralmente ramificada, amorfa e com um baixo grau de polimerização (*ca.* 200) [88]. As unidades de monossacarídeos que as constituem podem ser divididas em hexoses (D-glucose, L-arabinose, D-manose), pentoses (D-xilose, L-arabinose), ácidos hexurónicos (ácidos D-glucurónico, 4-O-metil-D-glucurónico e D-galacturónico) e desóxi-hexoses (L-ramnose e L-fucose) [92].

A cadeia principal das hemiceluloses pode ser constituída por uma única unidade, como é o caso das xilanas (Figura 2.19), ou por dois ou mais tipos diferentes de unidades, como por exemplo as glucomananas (Figura 2.20). Dos monossacarídeos constituintes das cadeias laterais, fazem parte por exemplo o ácido 4-*O*-metil-D-glucurónico, a galactose, a arabinose e a ramnose [92].

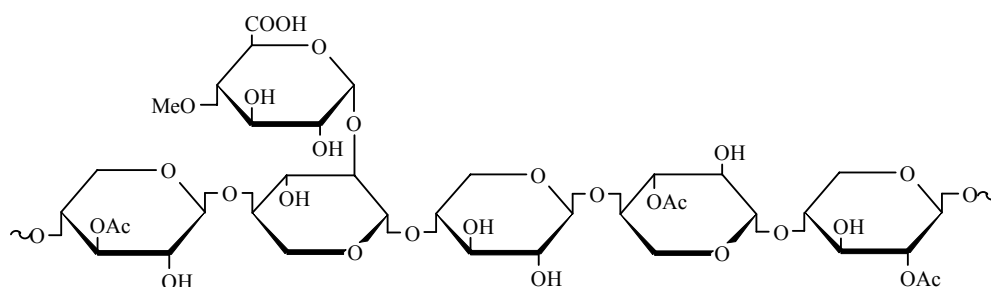


Figura 2.19. Estrutura molecular de uma *O*-acetil-4-*O*-metilglucuronoxilana [92].

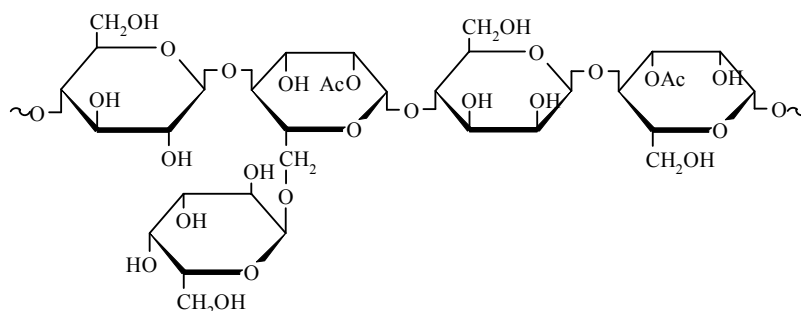


Figura 2.20. Estrutura molecular de uma galactoglucomanana [88].

Nas paredes celulares primárias de algumas espécies de monocotiledóneas, as xiloglucanas são as hemiceluloses predominantes, embora na sua maioria prevaleçam as glucuronoarabinoxilanas [36,93].

As xiloglucanas são polímeros ramificados, cuja cadeia principal é constituída por unidades de D-glucose (G) unidas entre si por ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$ e apresentam substituições laterais nos grupos OH em C₆ por unidades de xilose (X). Dois tipos gerais de xiloglucanas podem ser distinguidas, os poli-XXXG e os poli-XXGG, que diferem no grau de substituição dos resíduos de xilose. Algumas das unidades de xilose podem ser substituídas por outros açúcares, tais como a arabinose ou galactose, ou ainda por dissacarídeos de fucose e galactose. Este tipo de hemiceluloses encontra-se frequentemente *O*-acetiladas [36,94].

No caso das arabinoglucuronoxilanas a cadeia principal é constituída por unidades de xilose unidas por ligações $\beta(1\rightarrow4)$ e as substituições laterais são efectuadas quer por unidades de arabinose quer por unidades de ácido glucurónico e arabinose [36].

Outras hemiceluloses são as α -glucanas que constituem o amido, as quais podem ser de dois tipos: a amilose e a amilopectina (Figura 2.21), que apresentam estruturas e propriedades diferentes. A razão dos dois polissacarídeos varia de acordo com a origem botânica do amido [95].

Ao contrário da celulose, a amilose (Figura 2.21a) é um α -glucano linear, relativamente longo, que contém cerca de 99% de ligações $-\alpha(1\rightarrow4)$ e 1% de $-\alpha(1\rightarrow6)$. Embora o seu tamanho e estrutura difiram dependendo da origem da planta, apresenta um peso molecular da ordem de 10^5 - 10^6 [95].

A amilopectina (Figura 2.21b) é uma molécula muito maior que a amilose, com um peso molecular da ordem dos 10^7 - 10^9 e uma estrutura muito ramificada, constituída por cerca de 95% de ligações $-\alpha(1\rightarrow4)$ e 5% de $-\alpha(1\rightarrow6)$, que lhe confere uma elevada solubilidade. Tal como a amilose, o seu tamanho molecular, a sua forma, estrutura e polidispersidade variam com a origem da planta [88,95].

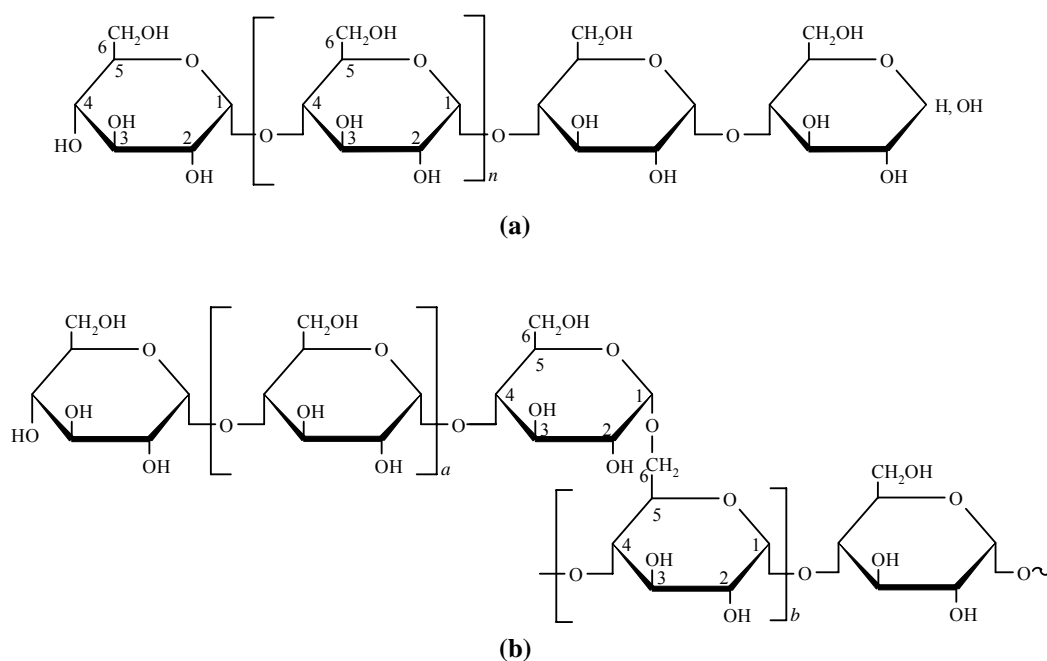


Figura 2.21. Estrutura da (a) amilose e (b) da amilopectina [95].

A presença de amido em duas variedades de bananeiras (*Musa paradisiaca* Linn e *Musa sapientum* Linn), foi estudada verificando-se que: *i*) o rizoma, o pseudo-tronco e o fruto apresentam um teor elevado de amido (31,6%, 25,5% e 59,6%, respectivamente); *ii*) a percentagem de amido no pseudo-tronco aumenta gradualmente até à inflorescência, onde atinge um valor máximo, após o que diminui ligeiramente e permanece praticamente constante até a colheita do fruto, *iii*) após a remoção do cacho, quando o pseudo-tronco permanece no campo, ocorre uma diminuição gradual no teor de amido ao longo do tempo [96].

As hemiceluloses das fibras da *Musa textilis* representam cerca de 21% da sua massa seca. A análise dos açúcares destas hemiceluloses evidenciou que estas são constituídas maioritariamente por xilose (83%), glucose (9%), arabinose (4%) e, por cerca de 11% de ácidos urónicos. A ramnose, manose e galactose foram também detectadas, embora em menores quantidades (*ca.* 0,4-2%). Estas hemiceluloses, quando sujeitas a oxidação com nitrobenzeno, acusaram a presença de lenhina e de ácidos cinâmicos, nomeadamente de ácido *p*-cumárico, o que indica que as hemiceluloses nas paredes celulares das fibras de abaca deverão estar ligadas a ácidos cinâmicos e/ou unidas directamente à lenhina [97].

De facto, nas monocotiledóneas, alguns estudos revelam que devido à sua natureza bifuncional, os ácidos ferúlico e *p*-cumárico parecem desempenhar uma função de intermediários nas ligações entre os polissacarídeos e a lenhina na parede celular.

Neste tipo de plantas, esta interligação parece ser efectuada maioritariamente por unidades de ácido ferúlico que se encontram em simultâneo: *i*) esterificados com determinados polissacarídeos, em particular com arabinoxilanas através do hidroxilo C5 de resíduos de α -L-arabinose constituintes das cadeias laterais e *ii*) eterificados com as unidades de fenilpropano da lenhina (Figura 2.22) [93,98-101].

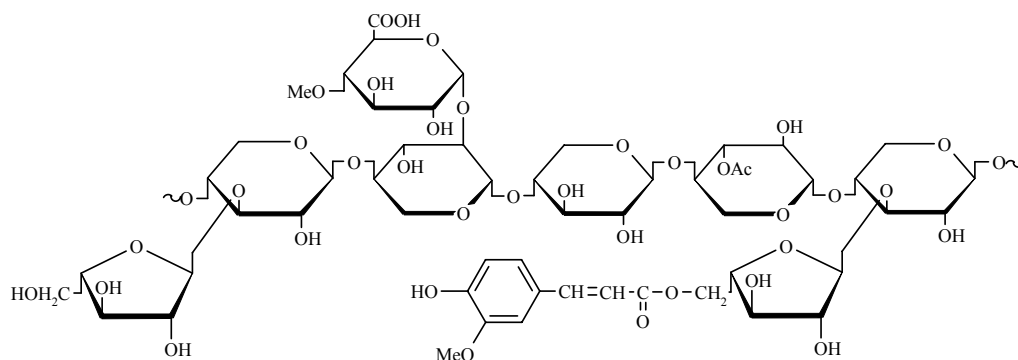


Figura 2.22. Estrutura de uma arabinoxilana de gramíneas [101].

2.3.6. LENHINA

A lenhina é, a seguir à celulose, o polímero mais abundante no reino vegetal. Do ponto de vista funcional, como constituinte da parede celular, a lenhina desempenha um papel importante no transporte interno de água, nutrientes e metabolitos, confere rigidez às paredes celulares, actuando como agente de ligação permanente entre as células, e impede a degradação da parede celular por microorganismos, insectos e outros herbívoros [102-104].

A lenhina é um heteropolímero aromático amorfo, com uma estrutura tridimensional irregular. É constituído por unidades derivadas do fenilpropano (C_6C_3) com diferentes padrões de substituição e unidas por vários tipos de ligações.

O conhecimento dos precursores e da biossíntese da lenhina permitiu compreender a sua estrutura heterogénea e generalizar ou prever algumas regras de construção, tipos de ligações e a sua natureza aromática. Os álcoois *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico (Figura 2.23), são considerados os precursores biossintéticos da lenhina, diferindo entre si somente no número de grupos metoxilo substituintes do anel aromático.

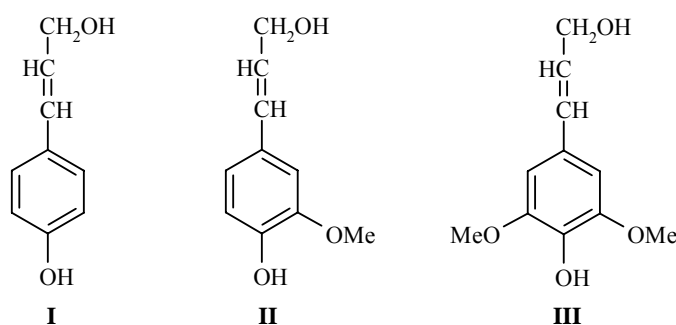


Figura 2.23. Monómeros precursores da lenhina: I. álcool *p*-cumarílico; II. álcool coniferílico e III. álcool sinapílico.

Na década de 30, foi proposto um modelo de biossíntese da lenhina, conhecido como o *modelo do acoplamento aleatório*. Este modelo centra a sua hipótese na formação da lenhina através de um acoplamento aleatório dos precursores individuais ao polímero de lenhina em crescimento, sendo este processo regulado pela quantidade e pelo tipo de fenóis individuais disponíveis no local de lenhificação e pelas propriedades de acoplamento químico [103-105]. Segundo este modelo, a polimerização dos álcoois cinâmicos ocorre segundo três etapas [102,104,105].

i) *Formação dos radicais fenoxilo.* Sob a acção de enzimas do tipo peroxidase e na presença de peróxido de hidrogénio e oxigénio, os álcoois são oxidados a radicais fenoxilo. Estes radicais são estabilizados por diversas formas de ressonância (Figura 2.24), sendo as estruturas I a V, as mais estáveis termodinamicamente e, por isso, as envolvidas na biossíntese da lenhina.

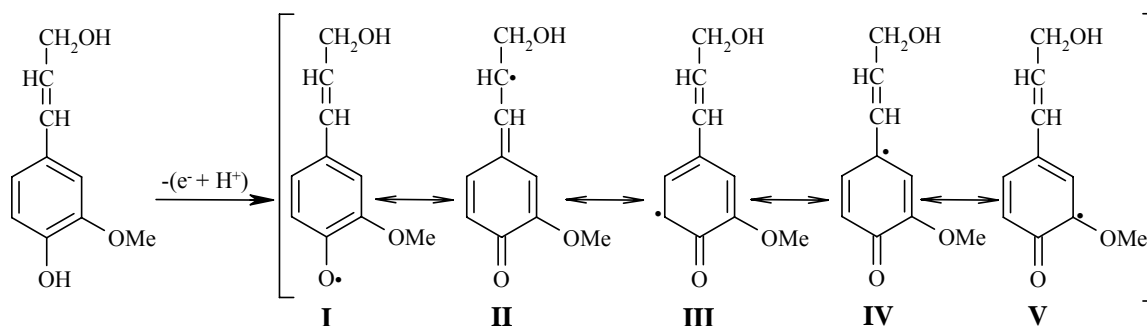


Figura 2.24. Radicais fenoxilo do álcool coniferílico formados por desidrogenação enzimática e estabilizados por ressonância [102,105].

ii) *Formação de dímeros e oligómeros.* Os radicais fenoxilo reagem entre si para formar dímeros e oligómeros. É um processo não enzimático, em que as ligações intermonómeros formadas dependem sobretudo da distribuição, em cada radical, da densidade electrónica e do impedimento estereoquímico. Os modos de acoplamento oxidativo aleatório dos radicais fenoxilo dos três tipos de unidades derivadas dos álcoois *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico são numerosos, no entanto, alguns são mais favoráveis e ocorrem em maior extensão na lenhina.

Dos vários tipos de ligações possíveis (Figura 2.25), as ligações éter alquil-arílico são as mais favoráveis termodinamicamente, como é o caso das ligações β -O-4, que constituem cerca de 48% a 60% das ligações intermoleculares na lenhina. Outros tipos de ligações comuns entre as unidades de fenilpropano são as que originam as estruturas condensadas do tipo 5-5' ou 2-6' (ligações carbono-carbono entre anéis aromáticos), 4-O-5' (ligações éter entre anéis aromáticos), β -5, β -6, β -1 (ligações carbono-carbono entre um anel aromático e a cadeia lateral de unidades adjacentes) e β - β (ligações entre cadeias laterais).

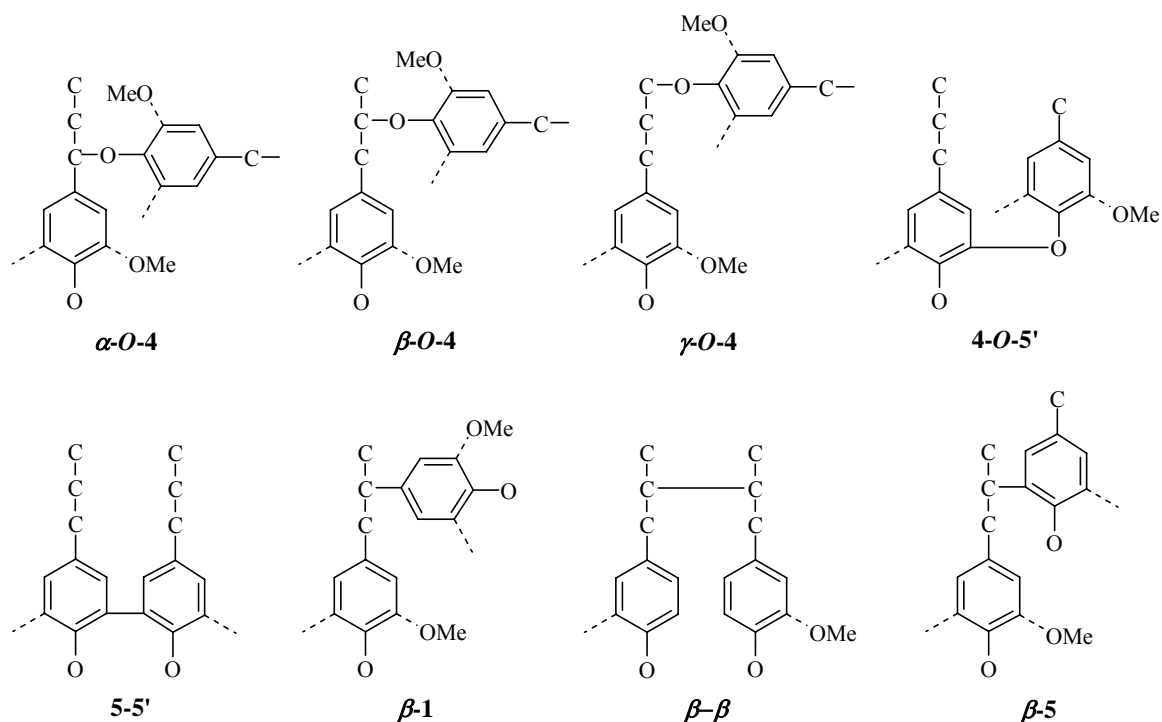


Figura 2.25. Ligações mais comuns entre as unidades fenilpropano na lenhina. As ligações dos grupos OCH_3 aos anéis aromáticos estão representadas a tracejado para evidenciar que as estruturas podem ter nenhum, um ou dois grupos OCH_3 .

iii) *Formação da lenhina.* A polimerização decorre por ligação sucessiva dos precursores monoméricos aos terminais do polímero em crescimento, frequentemente com a participação dos grupos fenólicos livres do dímero ou oligómero ou do monômero ou ainda, por acoplamento de dois grupos terminais radicalares.

Recentemente, alguns autores sugeriram um modelo alternativo para a biossíntese da lenhina, o modelo da proteína dirigente, que defende que a formação da lenhina não deverá ter origem num processo aleatório, antes ocorrendo sob uma regulação estrita de proteínas especializadas, as proteínas dirigentes, que controlam a formação de ligações individuais [104,106]. Dado que este modelo não está totalmente comprovado, o modelo de acoplamento aleatório continua a ser o modelo de referência para a biossíntese da lenhina.

As unidades aromáticas que constituem a lenhina são correntemente designadas por unidades *p*-hidróxifenilo (H), guaiacilo (G) e seringilo (S), as quais derivam dos álcoois precursores *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico, respectivamente. A diferença entre as

quantidades dos precursores é considerada um dos principais factores que contribuem para a grande heterogeneidade estrutural das lenhinas.

As lenhinas de plantas monocotiledóneas, em particular das gramíneas são classificadas como lenhinas do tipo *p*-hidróxifenilo/guaiacilo/seringilo (lenhina H/G/S). Contudo, este tipo de lenhinas tem a particularidade de possuir resíduos de ácidos cinâmicos, como os ácidos *p*-cumárico e ferúlico, ligados à sua estrutura através de ligações éster e/ou éter [102,107]. O teor em unidades H neste tipo de plantas é devido, principalmente, à presença dos resíduos de ácido *p*-cumárico, os quais se encontram maioritariamente esterificados à lenhina ou aos polissacarídeos [108]. Alguns estudos efectuados em gramíneas, revelam que os resíduos de ácido *p*-cumárico encontram-se exclusivamente ligados à posição γ das cadeias laterais da lenhina e estão ligados predominantemente às unidades S [109-112]. As unidades de ácido ferúlico, por outro lado, ocorrem em ambas as formas esterificada e eterificada, parecendo contudo, estabelecer ligações éster com os polissacarídeos, envolvendo no caso das gramíneas o grupo hidroxilo do carbono C5 de uma unidade de α -L-arabinose [99].

Embora não haja, até ao momento, um modelo estrutural que descreva as lenhinas das monocotiledóneas, na Figura 2.26, a título de exemplo, é apresentado o modelo para a estrutura da lenhina da madeira folhosa *Fagus sylvatica*, proposto por Nimz em 1974 [107]. Dos grupos funcionais existentes na lenhina, destacam-se os grupos metoxilo, os grupos hidroxilo fenólicos, alifáticos primários e secundários, os grupos éter e ainda os grupos carbonilo e carboxilo frequentemente conjugados, característicos das unidades do tipo cinamaldeído e ácido cinâmico [107].

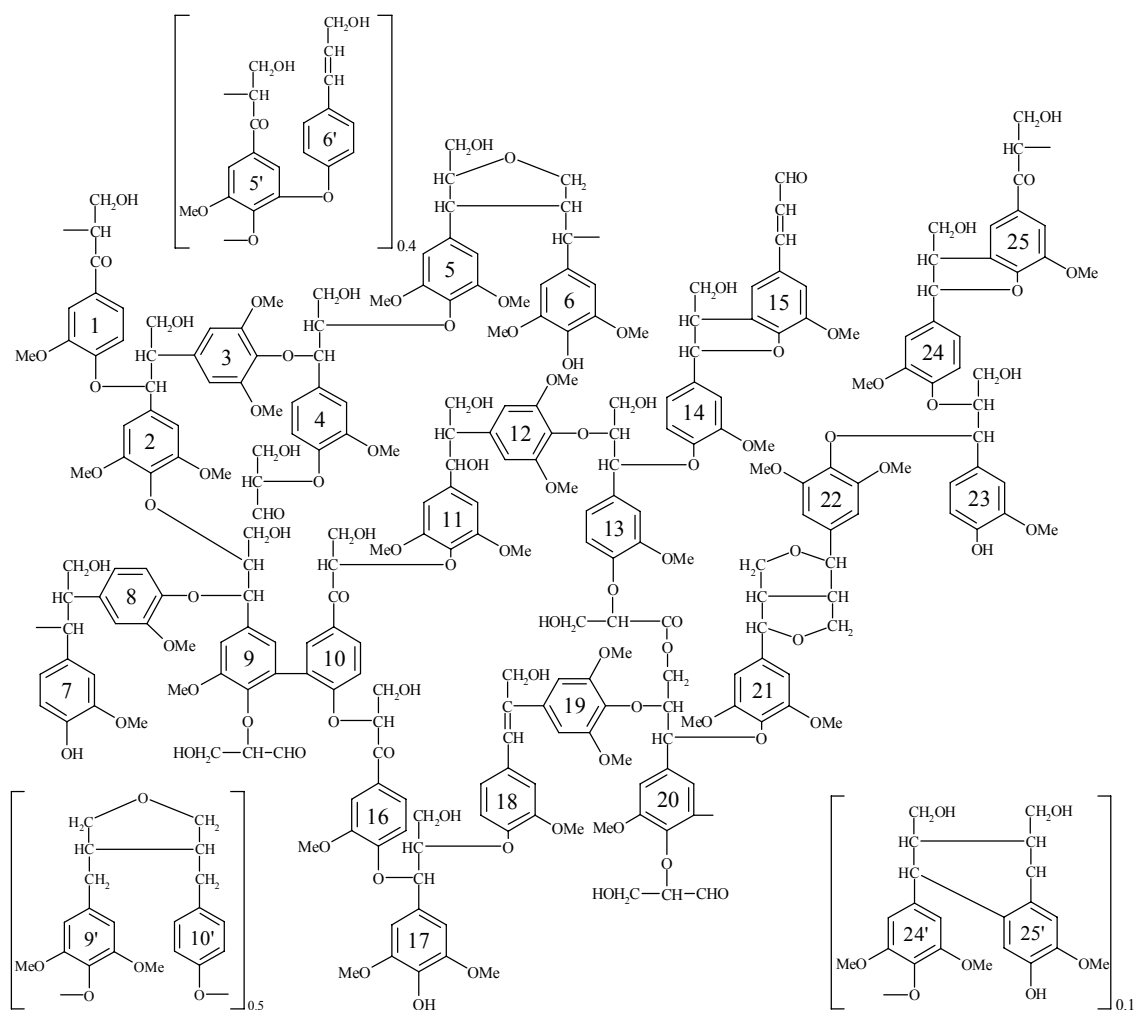


Figura 2.26. Modelo estrutural proposto para a lenhina da faia (*Fagus sylvatica*) [102].

Devido à sua função, estrutura molecular, localização e interligação com outros constituintes da parede celular, nomeadamente os polissacarídeos, torna-se impossível isolar a lenhina de uma forma quantitativa da parede celular mantendo a sua natureza heterogénea e a sua estrutura tridimensional intacta [113]. De facto, alguns estudos evidenciam a existência de ligações covalentes e/ou ligações por pontes de hidrogénio ou forças de Van der Waals entre a lenhina e os polissacarídeos, sendo esta associação entre a lenhina e os polissacarídeos conhecida como complexo lenhina-hidratos de carbono (LCC) [102,105,107]. As ligações lenhina-hidratos de carbono mais comuns são as ligações glicosídicas, éter e éster a grupos OH benzílicos (Figura 2.27) [102].

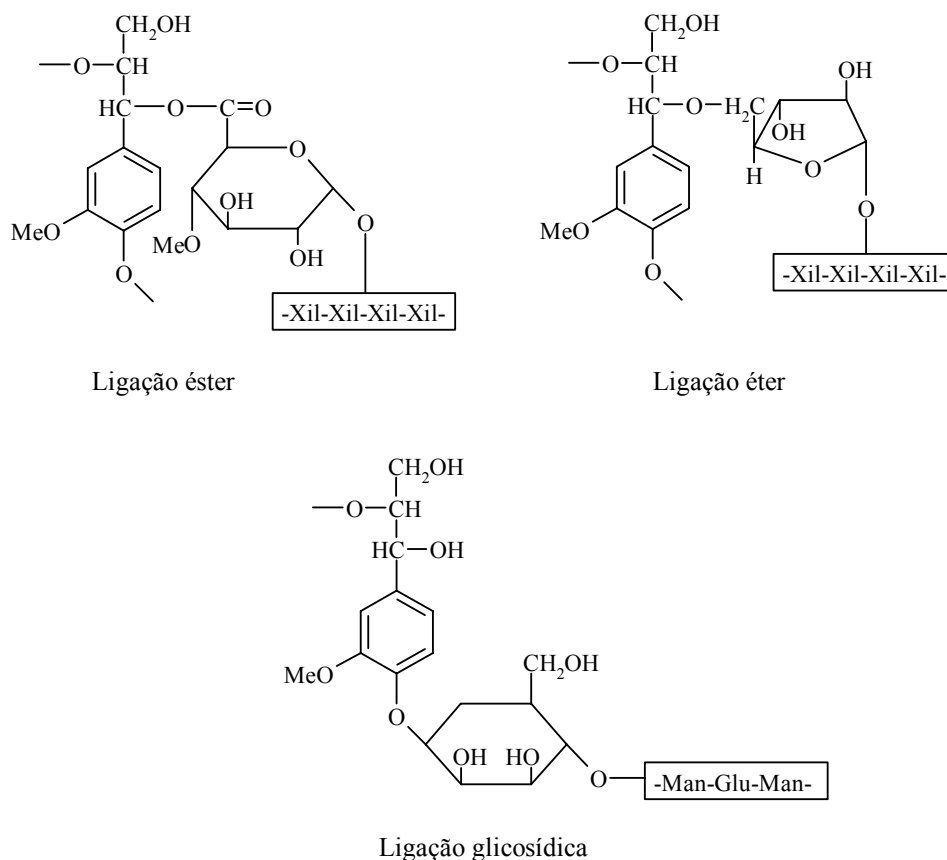


Figura 2.27. Tipo de ligações mais frequentes entre a lenhina e os polissacarídeos [102].

Os resíduos de xilose, galactose, arabinose e ácido 4-*O*-metilglucurônico, pela sua acessibilidade e abundância nestes complexos, são indicados como as unidades mais frequentes envolvidas neste tipo de ligações [102,105,107].

No caso particular das monocotiledóneas, a lenhina parece estar ligada largamente a hemiceluloses do tipo glucuronoarabinoxilana, através de cadeias laterais de arabinose. Neste tipo de plantas, as ligações lábeis em meio alcalino (ésteres) envolvendo pentoses (excepto ácido urónico) predominam sob as ligações estáveis em meio alcalino (ligações glicosídicas envolvendo resíduos de pentoses e glucose e ligações éter) [100].

Distribuição da lenhina

Ao contrário das madeiras, no caso das monocotiledóneas, os ácidos hidroxicinâmicos estão largamente envolvidos no processo de lenhificação das paredes celulares [110]. Os ácidos hidroxicinâmicos, em particular os ácidos *p*-cumárico e ferúlico, encontram-se abundantemente nas paredes celulares deste tipo de plantas e são

componentes importantes para a integridade, forma e defesa contra agentes patogénicos da parede celular [102,112] (Figura 2.28).

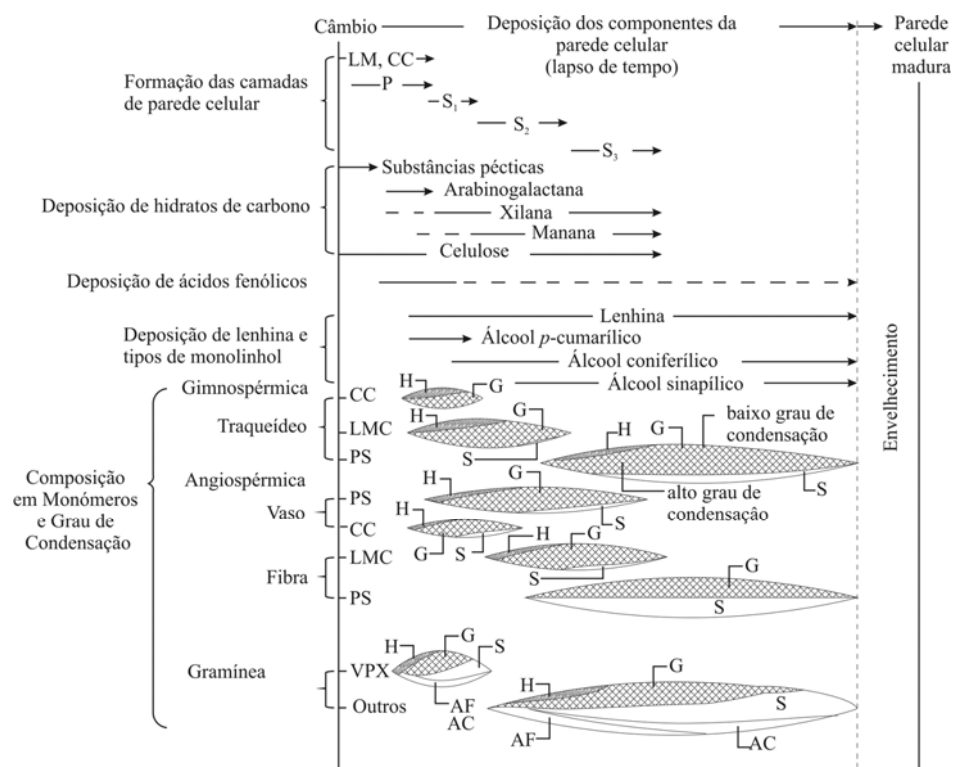


Figura 2.28. Representação esquemática da relação entre a formação/deposição dos polímeros da parede celular e o processo heterogéneo de lenhificação: CC- canto celular; LM- lamela média; P- parede primária; S₁, S₂ e S₃- camadas externa, média e externa da parede secundária; LMC- lamela média composta; PS- parede secundária; VPX- vasos do proto-xilema; AF- ácido ferúlico; AC- ácido *p*-cumárico; H- unidade H; G- unidade G; S-unidade S [112].

Dependendo da região morfológica e da fase de diferenciação, a composição e o teor destes ácidos fenólicos alteram. O ácido ferúlico deposita-se rapidamente nas paredes celulares num estado inicial da lenhificação, seguido do ácido *p*-cumárico que se deposita continuamente na forma de éster ou éter à medida que o processo decorre, tornando-se num constituinte predominante entre os ácidos hidroxicinâmicos. Todas as paredes celulares apresentam cerca de 5 a 15% destes ácidos relativamente à lenhina total, excepto os vasos do proto-xilema que contêm apenas cerca de 3 a 6%. Este facto, torna a lenhina deste tipo de plantas mais susceptível à degradação sob condições alcalinas [112].

Dada a sua bifuncionalidade, estes ácidos hidroxicinâmicos podem estar envolvidos em ligações éster e éter consoante a ligação seja estabelecida pelos sítios de ligação com a

função carboxílica ou fenólica, respectivamente. As moléculas de ácido ferúlico parecem estabelecer ligações éster com os polissacarídeos presentes na parede celular primária, proporcionando, conseqüentemente, sítios de iniciação por ligações éter para a lenhina [69,114,115]. Tais ligações cruzadas, aparentam ter uma influência profunda no crescimento da parede celular da planta assim como nas suas propriedades mecânicas e biodegradabilidade [116]. Relativamente ao ácido *p*-cumárico, tal como sucede com o ácido ferúlico, este encontra-se inicialmente em pequenas quantidades esterificado com arabinoxilanas no desenvolvimento da parede primária, passando a encontrar-se extensivamente esterificado com a lenhina à medida que a parede se desenvolve.

Durante a formação da parede celular, as unidades *p*-hidróxifenilo, guaiacilo e seringilo depositam-se de forma diferenciada. Resultados de vários estudos da composição da parede celular e lenhificação [93,109,117] mostram que a composição da lenhina na parede celular, altera durante o desenvolvimento da célula, passando de monolenhóis do tipo guaiacilo e ácido *p*-cumárico altamente condensados na lamela média a uma lenhina predominantemente do tipo guaiacilo na parede primária e numa parte da parede secundária, e por fim, a uma lenhina do tipo seringilo na parede celular secundária e numa fracção da parede primária [112,118].

Os estudos estruturais de lenhinas extraídas de musáceas são escassos, sendo os trabalhos existentes relativos à lenhina isolada a partir das fibras do pseudo-tronco da abaca (*Musa textilis*) [119,120]. De acordo com estes autores, esta lenhina é constituída maioritariamente por unidades S, apresentando proporções menores de unidades G e H. As unidades de fenilpropano encontram-se maioritariamente ligadas entre si através de ligações do tipo β -O-4, tendo sido também identificadas estruturas com ligações do tipo β - β , β -5 e 5-5'. A oxidação com nitrobenzeno e o RMN de ^{13}C acusaram a presença dos ácidos hidroxicinâmicos, *p*-cumárico e ferúlico, os quais se encontram ligados à lenhina por ligações éster e éter, respectivamente.

2.4. APLICAÇÕES TECNOLÓGICAS DA BANANEIRA/ENQUADRAMENTO DO TRABALHO

Como referido na Secção 1.1, as várias partes morfológicas da bananeira têm sido utilizadas ao longo dos tempos em várias aplicações. Recentemente, devido à grande quantidade de resíduos gerados pela actividade bananicultora assim como à natureza fibrosa dos mesmos, vários estudos têm sido feitos no que se refere à sua aplicação na produção de pasta e papel e na elaboração de compósitos.

A elevada percentagem de celulose presente nas bainhas foliares da *Musa acuminata* Colla (ca. 43%) levou a que esta matéria-prima fosse utilizada para a obtenção de pasta celulósica, que aplicada na produção de papel, apresentou boas propriedades físicas e mecânicas para a produção de cartão [21,121]. Para além da pasta de bananeira poder ser usada na produção de papel somente com pasta celulósica proveniente desta planta, pode ser combinada com outras pastas incluindo fibras recicladas [21,23].

O teor relativamente elevado de holocelulose encontrado nas bainhas foliares e ráquis, levou a que as suas fibras fossem também utilizadas no fabrico de materiais compósitos [12-20,122-126]. Devido ao carácter hidrofílico das fibras de bananeira, alguns autores constataram que, com a modificação química prévia da fibra com diferentes agentes ligantes (por exemplo, anidrido maleico e fenilisocianato), resultam compósitos de melhor qualidade. Além de reduzir em grande extensão a absorção de água e vapor, o tratamento das fibras com estes agentes, provoca um melhoramento das propriedades mecânicas dos materiais compósitos resultantes [19,122-127].

A maioria dos trabalhos efectuados centra-se no estudo de técnicas de fabrico e das propriedades físicas e mecânicas de compósitos de poliéster reforçados com fibras de bananeira [13,15-17,19]. De entre as várias aplicações industriais possíveis, destaca-se o seu uso como isolantes eléctricos e acústicos [12] e em materiais de construção [17].

Apesar da existência destes estudos referentes ao uso das bainhas foliares e do ráquis, na produção de pasta celulósica e na incorporação em compósitos, os estudos envolvendo a composição química e caracterização estrutural dos constituintes maioritários das várias partes morfológicas da bananeira, em particular da ‘Dwarf Cavendish’, são escassos.

Para um melhor aproveitamento destes resíduos, em particular para uma possível aplicação na produção de pasta e papel, diversas áreas fundamentais do conhecimento desta espécie necessitam de ser elucidadas, nomeadamente a sua composição química, a composição dos extractáveis lipofílicos e a estrutura da lenhina.

Assim sendo, o aprofundamento do conhecimento da composição química desta espécie constituiu a principal razão da realização deste trabalho.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. AMOSTRAGEM/ PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE

A matéria-prima utilizada neste estudo foi recolhida em Março de 2002, na zona de São Martinho, concelho do Funchal. Esta baseou-se em dez cultivares de ‘Dwarf Cavendish’ logo após a colheita do respectivo fruto.

Após a recolha, as várias partes morfológicas da planta (nervuras/pecíolos, limbos, talo floral, bainhas foliares e ráquis) foram cortadas em pedaços de pequenas dimensões (ca. 4×3 cm) e colocadas a secar ao ar durante aproximadamente duas semanas.

Uma vez secas, cada uma das amostras foi moída num moinho de martelos (SK100 da Retsch) e de seguida o material moído foi peneirado num crivo vibratório (Retsch, tipo AS200), tendo-se utilizado a fracção de granulometria 40-60 mesh (425-250 µm) para as análises posteriores.

3.2. METODOLOGIA ANALÍTICA

Os procedimentos experimentais usados ao longo deste trabalho estão, na sua maioria, optimizados para análises de madeiras. Contudo, com vista à sua melhor adaptação à natureza das amostras em estudo, as metodologias foram objecto de adaptações pontuais. Para cada parâmetro analisado foram realizadas pelo menos duas réplicas concordantes.

Em todas as análises foi determinada a humidade das amostras através do uso de uma balança de humidade (Gibertini-Eurotherm).

Relativamente aos solventes e reagentes utilizados, estes foram na sua maioria comerciais de pureza analítica (*p.a.*) tendo em atenção as análises estruturais a realizar posteriormente.

3.3. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA SUMÁRIA DO MATERIAL DE PARTIDA

3.3.1. ESPECTROSCOPIA DE FTIR-ATR

Devido à natureza fibrosa e opacidade apresentadas pela maioria dos materiais lenhocelulósicos, os espectros de FTIR traçados em pastilhas de KBr, apresentam-se em geral mal resolvidos, dificultando a sua análise. Um método alternativo e muito útil para materiais sólidos e fibrosos é a espectroscopia de infravermelho com atenuação da reflexão total (interna) (FTIR-ATR), acoplado a um acessório de diamante de reflexão única [128].

Os espectros de FTIR-ATR das amostras do material com e sem extractáveis, previamente prensadas, foram obtidos num espectrofotómetro Bruker IFS-55, equipado com um *Golden Gate Specac*, com uma resolução de 8 cm^{-1} e 256 scans.

3.3.2. ESPECTROSCOPIA DE RMN CP/MAS DE ^{13}C

Os espectros de RMN CP/MAS de ^{13}C do material com e sem extractáveis foram adquiridos a 100,6 MHz (9,4 T) num espectrómetro MSL-400 da Bruker. As amostras foram empacotadas em rotores de 7 mm que rodaram segundo o ângulo mágico a uma frequência de 5,0 KHz. A duração do impulso de 90° foi de *ca.* 4 μs . O tempo de contacto escolhido para a polarização cruzada foi de 2 ms e o intervalo entre scans foi de 5s.

3.3.3. TEOR EM ÁGUA

O teor em água dos diferentes tecidos vegetais foi determinado gravimetricamente pela perda de massa das respectivas amostras, antes e após a secagem à temperatura ambiente, com a respectiva correcção para a humidade residual (balança Gibertini-Eurotherm).

3.3.4. CINZAS

A percentagem de cinzas foi determinada gravimetricamente por calcinação numa mufla Nabertherm a uma temperatura de 600°C durante 6 horas.

3.3.5. EXTRACTÁVEIS

A quantificação dos extractáveis foi efectuada utilizando uma sequência de extracções de pelo menos 10 horas cada, com vários solventes. A sequência de solventes seguida foi: diclorometano, etanol/tolueno (2/1, v/v) e, por fim, água.

Foram realizadas três réplicas a 25 g de amostra em soxhlet com 600 mL de solvente em cada extracção.

Na preparação das amostras para as análises que requerem a prévia extracção do material vegetal, os extractáveis foram determinados segundo a norma Tappi Standard T 204 om-88. Assim, para todas as partes morfológicas em estudo, foram efectuadas extracções com etanol/tolueno (1/2, v/v) e água, com excepção dos limbos, que foram submetidos a uma extracção prévia com diclorometano.

O material extraído foi seco à temperatura ambiente. Os extractos foram evaporados separadamente num evaporador rotativo (Büchi R-200), equipado com bomba de vácuo (Büchi Vac[®] V-500) e com um banho (Büchi B-490) a uma temperatura máxima de 40°C e secos sob vácuo, até peso constante. O teor em extractáveis foi determinado gravimetricamente.

3.3.6. PROTEÍNAS

O método mais frequentemente utilizado na determinação de azoto é o método de Kjeldhal [129].

Neste trabalho, a determinação do azoto orgânico foi feita com base no procedimento padrão de digestão/preparação do material foliar para o doseamento do azoto total, optimizado pelo Laboratório de Qualidade Agrícola da Madeira.

Deste modo, em tubos de digestão contendo 0,3 g de material extraído, pesados rigorosamente, foram adicionados 5mL de uma solução de digestão (mistura de ácido sulfúrico e selénio), após o qual foi deixado reagir durante uma noite à temperatura ambiente. De seguida, as amostras foram colocadas numa placa de aquecimento a 100°C, ficando a reagir a esta temperatura durante 1 hora. Após arrefecimento à temperatura ambiente, foram adicionados cuidadosamente 0,5 mL de peróxido de hidrogénio a 30% a cada amostra. Regulou-se a placa de aquecimento para 200°C e colocaram-se as amostras

sobre a mesma, deixando-as a reagir durante 15 min a esta temperatura. Ao fim deste tempo, a placa de aquecimento foi regulada para 330°C e passadas 2 horas, notou-se uma alteração da coloração das misturas para amarelo claro, indicando o fim do processo de digestão. As amostras foram retiradas da placa e deixadas a arrefecer. Com as amostras à temperatura ambiente, foi adicionado um pouco de água, facilitando a dissolução do digerido.

Após os digeridos serem devidamente filtrados para balões volumétricos, estes foram aferidos com água bidestilada e tapados até o respectivo doseamento do azoto.

Para a determinação do teor de azoto orgânico, titulou-se a solução obtida por destilação das amostras num destilador de Kjeldahl Selecta Alcodest, com ácido clorídrico.

O teor em proteínas foi calculado através do produto entre a percentagem de azoto e o factor de 4,4 o qual, de acordo com alguns autores, no caso das plantas, permite a obtenção de uma boa estimativa do teor das proteínas vegetais [130].

3.3.7. LENHINA DE KLASON E LENHINA SOLÚVEL

A determinação quantitativa da lenhina foi efectuada pelo método padronizado de Klason [131] descrito na norma T222 om-88 com algumas alterações. Este método consiste no tratamento do material com ácido sulfúrico com vista à hidrólise dos polissacarídeos, sendo a lenhina recuperada como resíduo insolúvel. Assim, a 1g de material extraído, pesado rigorosamente, foram adicionados 15 mL de H₂SO₄ a 72%, tendo sido o copo coberto com um vidro relógio e mantido durante 12 horas à temperatura ambiente (20-25°C), com agitação frequente de forma a assegurar a máxima dissolução do material vegetal. O conteúdo foi transferido para um balão de fundo redondo de 1 litro e diluído com um volume total de água de 560 mL (concentração final do ácido é aproximadamente 3%). A mistura foi refluxada durante quatro horas e, posteriormente, deixou-se em repouso durante a noite.

Filtrou-se a mistura num cadinho com placa de porosidade 4, previamente seco a 105°C e tarado (uma porção do filtrado foi recolhida para a determinação da lenhina solúvel de Klason). O resíduo insolúvel foi lavado, com água destilada quente até pH neutro, e seco para quantificação gravimétrica. A percentagem de lenhina insolúvel foi corrigida para o teor em cinzas e o teor de humidade relativa.

Dado que durante este processo uma parte da lenhina é solubilizada, tornou-se necessário efectuar a sua quantificação na fracção solúvel, para a qual contribuem também os complexos lenhina-hidratos de carbono solubilizados durante o tratamento com ácido concentrado [132].

O conteúdo em lenhina solúvel foi determinado por espectrofotometria de UV, através da medição da absorvância a 205 nm da porção de filtrado recolhida [133,134]. Para o efeito, foi utilizado um espectrofotómetro Shimadzu (UV-1603). A selecção do comprimento de onda a 205 nm baseou-se em estudos anteriores, que revelaram que o máximo de absorção a 280 nm é influenciado pelos produtos de degradação dos hidratos de carbono, como o furfural [133].

3.3.8. PENTOSANAS

A percentagem de pentosanas foi determinada segundo o método do brometo/bromato [135]. Neste método, as hemiceluloses são hidrolisadas em meio ácido a quente, transformando a xilose e outras pentoses libertadas em furfural, o qual é recolhido como destilado e quantificado por titulação redox. É de referir que parte dos ácidos urónicos, assim como parte das hexosanas, poderão ser convertidos em furfural e hidroximetilfurfural, respectivamente, sendo por conseguinte contabilizados como xilanas.

A 0,1 g de material vegetal extraído foram adicionados 20 mL de HCl a 13% e a mistura mantida em refluxo de forma a recolher o destilado. Por cada 5 mL de destilado obtido, foi reposto o mesmo volume da solução de HCl a 13%, até ser obtido o volume total de 100 mL de destilado. A 25 mL de destilado (3 ensaios), foram adicionados 75 mL de água e 5 mL de solução 0,05 M de KBr/KBrO₃ (proporção molar 5/1) e a solução deixada durante uma hora, na ausência de luz. Após esse período, foram adicionados 20 mL de KI a 10% e, 10 minutos depois, o I₂ libertado foi titulado com uma solução padronizada de Na₂S₂O₃ 0,05 M.

3.3.9. CELULOSE DE KÜRSCHNER-HOFFNER

A celulose foi determinada segundo o método de Kürschner e Hoffner [135]. Este método, que consiste na obtenção da celulose como resíduo insolúvel, envolve uma etanólise ácida que permite a eliminação da lenhina, na forma de compostos solúveis em etanol, bem como parte das hemiceluloses. Para tal, o material vegetal extraído (2 g) foi

submetido a refluxo com 50 mL de solução etanólica de HNO_3 (10 mL de HNO_3 a 65% e 40% mL de etanol a 96%) durante uma hora. Após este tempo, o sobrenadante foi retirado por decantação e uma nova porção de solução etanólica de HNO_3 (igual à anterior) foi adicionada, seguindo-se uma hora de refluxo. Repetiu-se mais duas vezes o procedimento anterior. Por fim, o resíduo foi filtrado num cadinho filtrante de porosidade 2, lavado com água quente e seco para determinação gravimétrica. A percentagem de celulose obtida para as várias amostras foi corrigida para o teor de cinzas, lenhina de Klason, pentosanas e amido.

3.3.10. AMIDO

A determinação do amido foi efectuada com base no método descrito por Humphreys e Kelly [137].

Num tubo de ensaio, a cerca de 80 mg de material vegetal (antes e após extracção) foram adicionados 4,7 mL de ácido perclórico a 7,2 M. Após 10 minutos de reacção sob agitação regular, a mistura foi transferida para um balão volumétrico de 50 mL e o volume completado até à marca com água. Após centrifugação da mistura anterior, 10 mL do sobrenadante foram transferidos para um outro balão volumétrico de 50 mL, ao qual foi adicionada uma gota de fenolftaleína. De seguida, depois da solução ficar alcalina por adição de uma solução de NaOH a 2M, foi adicionado ácido acético a 2M até o desaparecimento da cor.

A esta solução foram adicionados 2,5 mL de ácido acético a 2M seguidos de 0,5 mL de iodeto de potássio a 10% e 5 mL de iodato de potássio a 0,01M. Após 15 minutos na ausência da luz, perfez-se o volume do balão volumétrico e a absorvância da solução foi medida a 650 nm num espectrofotómetro de UV-Vis (UV-1603 Shimadzu) contra um branco preparado simultaneamente com as amostras.

Para a quantificação do amido foi efectuada uma curva de calibração com soluções de amido de diferentes concentrações que, tal como as amostras, foram submetidas a todo o processo descrito anteriormente.

3.3.11. HOLOCELULOSE

A holocelulose foi determinada pelo método do ácido peracético sugerido por Poljack [135]. O material vegetal sem extractáveis (5g) foi suspenso em 250 mL de uma solução de

ácido peracético a 10% num banho a 90°C. Quando a mistura atingiu os 75°C, foi mantida a essa temperatura durante 60 min, após a qual foram adicionados 250 mL de água destilada a 50°C. A holocelulose foi isolada por filtração num cadinho filtrante de porosidade 2, lavada abundantemente com água a 50°C e com uma mistura de acetona/etanol (1/1,v/v) e, finalmente seca para quantificação gravimétrica.

Determinou-se ainda a percentagem de cinzas, lenhina de Klason e amido nas holoceluloses obtidas, vindo a percentagem final de holocelulose corrigida para esses valores.

3.3.12. HEMICELULOSES

Devido à solubilidade que as hemiceluloses apresentam em soluções alcalinas, estas podem ser isoladas através da extracção sucessiva da holocelulose com soluções de KOH [138]. O meio alcalino é efectivo na ruptura das ligações de hidrogénio entre a celulose e as hemiceluloses fortemente associadas. Contudo, algumas delas são sensíveis à degradação alcalina e por isso a extracção deve ser realizada na presença de uma atmosfera inerte, à temperatura ambiente e na presença de borohidreto de sódio. Os extractos não-celulósicos podem ser fraccionados por precipitação dos polissacarídeos com ácido acético e etanol. Os polissacarídeos na última fracção (hemicelulose B) são geralmente mais solúveis em meio alcalino devido à sua estrutura altamente ramificada e menor grau de polimerização que a hemicelulose A [45].

Isolamento das hemiceluloses. O tratamento consistiu numa primeira extracção da holocelulose (cerca de 3g), à temperatura ambiente durante 2 horas e sob atmosfera de azoto, com 100 mL de uma solução aquosa de KOH a 5% contendo 14 mg de NaBH₄. Após filtração e lavagem, o resíduo fibroso foi submetido a nova extracção, nas mesmas condições, com 100 mL de KOH a 24% contendo 14 mg de NaBH₄.

O extracto obtido com a solução de KOH a 5%, designado por hemicelulose A e com a solução de KOH a 24%, correspondente à hemicelulose B, foi acidificado até pH 5-6 com ácido acético glacial, seguido de precipitação em excesso de etanol a 95%, com agitação vigorosa. Os resíduos foram centrifugados, lavados com etanol a 95% e posteriormente com éter etílico. As hemiceluloses A e B foram secas para quantificação e o seu conteúdo em cinzas foi determinado por análise termogravimétrica (TGA).

3.3.13. α -CELULOSE

O resíduo obtido, após o isolamento da hemicelulose A e da hemicelulose B, designado por α -celulose, foi filtrado num cadinho filtrante de porosidade 2, lavado com água até à neutralidade, com acetona e finalmente seco para quantificação gravimétrica [138]. A percentagem de α -celulose foi corrigida para o teor em cinzas.

3.3.14. AÇÚCARES NEUTROS

Os polissacarídeos foram hidrolisados por tratamento de cerca de 10 mg de amostra com 400 μ L de H_2SO_4 a 72% a 20°C durante 3 horas, seguida de uma nova hidrólise ácida durante 2 horas e 30 minutos a 100°C, após a adição de 4,4 mL de água. Os monossacarídeos foram analisados como acetatos de alditol [139]: o hidrolisado foi arrefecido e foi adicionado 200 μ L de solução de padrão interno (2-desoxiglucose, 20mg/mL). A 1 mL da mistura anterior foram adicionados 200 μ L de NH_3 a 25% seguida de uma redução dos monossacarídeos a alditóis por adição de 100 μ L de uma solução de NH_3 a 3M contendo 150 mg/mL de $NaBH_4$. Após 1 hora a 30°C, foi adicionado 50 μ L de ácido acético glacial e agitou-se. Adicionou-se mais 50 μ L de ácido acético glacial e voltou-se a agitar. A acetilação dos alditóis foi feita por adição de 0,45 mL de 1-metilimidazol e 3 mL de anidrido acético a 0,3 mL da mistura anterior. Esta solução foi mantida a 30°C durante 30 minutos. Os acetatos de alditol foram extraídos com diclorometano e a fase orgânica foi lavada várias vezes com água. O solvente foi evaporado sob atmosfera de azoto, sendo qualquer resíduo de água ainda existente eliminado por co-evaporação com acetona. Da mesma forma, foram preparadas soluções padrão para identificação e elaboração de curvas de calibração para quantificação de cada monossacarídeo.

A quantificação dos acetatos de alditol foi feita num cromatógrafo de gás Varian 3350, equipado com uma coluna capilar DB-225 J&W (30 m \times 0,25 mm i.d., com 0,15 μ m de espessura de filme) e detector FID, usando N_2 como gás de arraste. As condições cromatográficas foram as seguintes: temperatura do injector 220°C; temperatura inicial da coluna 220°C (5 min), gradiente de temperatura 10°C/min, temperatura final da coluna 230°C (6 min); temperatura do detector 230°C.

3.4. ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRACTÁVEIS LIPOFÍLICOS

3.4.1. EXTRACÇÃO

O material vegetal foi submetido a uma extracção de Soxhlet com diclorometano, durante 10 horas. O solvente foi evaporado até à secura e o extracto seco foi quantificado gravimetricamente.

3.4.2. HIDRÓLISE ALCALINA

Cerca de 20 mg de cada extracto em diclorometano foram dissolvidos em 10 mL de uma solução de KOH a 1M em metanol/água (9/1, v/v). As misturas foram aquecidas a 100°C, sob atmosfera de azoto, durante 1 hora. As misturas reaccionais foram arrefecidas, acidificadas com uma solução de HCl 1M até pH~2 e extraídas três vezes com diclorometano. O solvente foi evaporado até à secura [140,141].

3.4.3. CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL

Antes da análise por GC-MS, cerca de 20 mg de cada extracto (antes e após hidrólise) foram dissolvidos em 250 µl de piridina e os compostos contendo grupos hidroxilo e carboxilo livres foram convertidos em éteres e ésteres trimetilsililados, respectivamente, por adição de 250 µl de bis (trimetil)trifluoroacetamida (BSTFA) e de 50 µl de trimetilclorosilano. A mistura permaneceu a 70°C durante 30 min e de seguida foi analisada por GC-MS [140-142].

De forma a confirmar a identificação de alguns esteróis na forma de derivados acetilados, uma alíquota do extracto em diclorometano das bainhas foliares foi tratado com anidrido acético, em piridina, a 100°C durante 1h, tendo sido posteriormente submetido a sililação, como descrito anteriormente, e analisada por GC-MS.

A análise por GC-MS foi efectuada usando um cromatógrafo, Trace Gas Chromatograph 2000 Series, equipado com um espectrómetro de massa Finnigan Trace MS, usando hélio como gás de arraste (35 cm/s), equipado com uma coluna capilar DB-1 J&W (30 m × 0,32 mm i.d., 0,25 µm de espessura de filme). As condições cromatográficas foram as seguintes: temperatura inicial: 80°C (5 min); gradiente de temperatura: 4°C/min; temperatura final: 285°C (10 min); temperatura do injector: 290°C; temperatura da linha de transferência: 290°C; razão de split: 1/100.

De forma a verificar a presença de estruturas esterificadas, os extractos em diclorometano foram também analisados por GC-MS usando uma coluna capilar DB-1 J&W (15 m × 0,32 mm i.d., com 0,25 de espessura de filme). As condições cromatográficas foram as seguintes: temperatura inicial: 100°C (3 minutos); gradiente de temperatura: 5°C/min; temperatura final: 340°C (12 minutos); temperatura do injector: 320°C; temperatura da linha de transferência: 290°C; razão de split: 1/100.

Os vários componentes foram identificados por comparação dos seus espectros com a biblioteca Wiley-Nist, nos tempos de retenção obtidos em condições experimentais idênticas [140,141] e, em alguns casos, por comparação dos padrões de fragmentação com dados publicados [142-155].

Para a análise quantitativa, o equipamento de GC-MS foi calibrado com compostos de referência puros, representativos dos principais grupos de compostos lipofílicos presentes nos extractos (nomeadamente, o ácido hexadecanóico, o 1-eicosanol, o ácido 16-hidróxihexadecanóico, o ácido 2-hidróxi-octadecanóico, o estigmasterol e o ácido ferúlico relativamente ao padrão interno utilizado, o tetracosano). Os respectivos factores de multiplicação foram calculados como uma média dos resultados de seis injecções.

Duas alíquotas de cada extracto foram analisadas antes e após hidrólise alcalina, tendo sido cada alíquota injectada em triplicado. Os resultados apresentados correspondem a uma média dos valores obtidos para cada parte.

3.5. CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DAS HEMICELULOSES A E B

3.5.1. TEOR EM CINZAS E MONOSSACARÍDEOS

A percentagem de cinzas nas hemiceluloses foi determinada por análise termogravimétrica, num aparelho TGA-50 da Shimadzu. Para a análise foram utilizados cerca de 10 mg, as quais foram colocadas em cápsulas fechadas e a análise efectuada em atmosfera de oxigénio com uma razão de aquecimento de 10°C/min até aos 800°C.

Os monossacarídeos foram determinados pelo método dos açúcares neutros descrito na Secção 3.3.14.

3.5.2. ESPECTROSCOPIA DE RMN DE ^1H

As hemiceluloses A e B foram dissolvidas em D_2O e o espectro de próton foi adquirido a 60°C num espectrómetro Bruker AMX 300 a 300.13 MHz utilizando as seguintes condições: tempo de relaxação 10.2 μs , pulso de 90° , 400 scans e intervalos de 12 s entre os scans. Os desvios químicos foram referenciados relativamente ao 3-(trimetilsilil)propionato- d_4 de sódio (δ 0.00).

3.5.3. CROMATOGRAFIA DE PERMEACÃO EM GEL

As hemiceluloses foram dissolvidas num pequeno volume de solução de LiCl (10% LiCl em *N,N*-dimetilacetamida) a $70\text{--}80^\circ\text{C}$, e posteriormente diluída com *N,N*-dimetilacetamida até uma concentração em hemiceluloses de cerca de 4 mg/mL. A análise por GPC foi realizada em duas colunas Plgel 10 μm MIXED B 300×7.5 mm num aparelho PL-GPC 110 system (Polymer Laboratories Ltd., U.K.) e detector de índice de refração. As colunas, sistema de injeção e detector foram mantidos a 70°C durante a análise. A velocidade de fluxo do eluente (solução de LiCl 0,1 M em *N,N*-dimetilacetamida) foi de 0,9 mL/min. A coluna analítica foi calibrada com polímeros standard (pullulan, Polymer Laboratories) no intervalo de massas de 0,8-100 kDa.

3.6. ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DA LENHINA

3.6.1. ISOLAMENTO DAS LENHINAS

Apesar de haver vários métodos de isolamento da lenhina [102,105,156,157], os métodos mais utilizados para a sua caracterização estrutural são o método de Björkman [158] e o método de acidólise [159]. Embora o último tenha sido o adoptado neste trabalho, para todas as partes morfológicas da bananeira em estudo, as respectivas lenhinas de Björkman ou MWL (“Milled Wood Lignin”) foram também isoladas, a fim de comparar os resultados obtidos em termos de rendimento e pureza.

3.6.1.1. Isolamento da Lenhina de Björkman

A lenhina de Björkman [158] é largamente utilizada nos estudos de caracterização estrutural da lenhina, sendo considerada, em geral, representativa da lenhina *in situ* [102,105,158]. Contudo, devido aos rendimentos de extracção relativamente baixos que

normalmente apresenta, dependendo da extensão do processo de moagem, a sua representatividade relativamente à lenhina *in situ* é questionável [156,157,160,161]. Constituindo um ensaio preliminar, as lenhinas de Björkman das várias partes morfológicas da bananeira foram isoladas de acordo com o método originalmente descrito por Björkman [158].

Isolamento da lenhina de Björkman. Cerca de 15 g de material vegetal de granulometria inferior a 140 mesh, previamente extraído com etanol/tolueno e água e seco, foi colocado num recipiente de zircónio e coberto com esferas de zircónio de diferentes diâmetros ($K_p=0,12$). Como meio de dispersão foram adicionados 100 mL de tolueno. A maceração foi efectuada num moinho centrífugo de bolas, Retsch S100, decorrendo ininterruptamente durante 96h à temperatura ambiente. O tolueno foi removido por centrifugação e o resíduo foi extraído com uma mistura de dioxano:água (96/4, v/v) (10 mL/g de material) durante 24h com agitação constante. A amostra foi centrifugada e o resíduo extraído durante 24h com uma nova porção da mistura dioxano-água com agitação constante. Repetiu-se o processo anterior mais duas vezes. As fracções líquidas obtidas foram reunidas e evaporadas até à secura. O resíduo foi dissolvido no mínimo volume possível de ácido acético a 90% e precipitado em água (*ca.* 3L) sob agitação forte. A lenhina de Björkman, recuperada por centrifugação e seca num excicador sob vácuo com P_2O_5 , foi quantificada gravimetricamente.

Neste trabalho, as lenhinas de Björkman serão designadas por LB+ Iniciais das Partes Morfológicas: **LB_{NP}** – Lenhina de Björkman das Nervuras/Pecíolos; **LB_L** - Lenhina de Björkman dos Limbos; **LB_{TF}** - Lenhina de Björkman do Talo Floral; **LB_{BF}** - Lenhina de Björkman das Bainhas Foliares e **LB_R** - Lenhina de Björkman do Ráquis.

3.6.1.2. Extração Alcalina

A cerca de 25 g de material extraído foram adicionados 1000 mL de uma solução de NaOH a 0,3%, tendo sido a mistura mantida sob refluxo e atmosfera de azoto durante 1 hora. O material extraído foi filtrado e lavado com água destilada até pH neutro e seco à temperatura ambiente [162].

3.6.1.3. Isolamento da Lenhina por Acidólise

O método de acidólise utiliza a combinação de um bom solvente para a lenhina, o dioxano, com condições levemente ácidas. Este método, comparativamente com o de Björkman, tem como principais vantagens: pouco tempo requerido para o isolamento, bom rendimento e representatividade da lenhina em relação à lenhina *in situ* e ainda uma baixa percentagem de polissacarídeos no material isolado. Embora este método apresente a desvantagem de ser um pouco mais degradativo, devido à ocorrência de reacções de condensação na lenhina durante a acidólise [131,155], as alterações estruturais da lenhina dioxano são moderadas e conhecidas, pelo que o seu impacto na análise estrutural da lenhina pode ser previsto [134,160,163,164].

No presente trabalho foi usado o método de acidólise original descrito por Monties [159] e o método descrito por Pascoal Neto e outros [162].

Isolamento da lenhina dioxano. No método adaptado por Pascoal Neto e outros [162], em substituição do único refluxo de 4h do material em solução dioxano/água, 9/1 (v/v) e HCl a 0,2M em atmosfera de azoto, sugerido no método original [159], são efectuadas três extracções, a primeira de 40 minutos e as outras duas de 30 minutos, com uma solução renovada (dioxano/água, 9/1 v/v e HCl a 0,2 M) após cada extracção. Por fim, é efectuada uma quarta extracção de 30 minutos com apenas uma mistura dioxano:água (9/1,v/v). Após as extracções, o resíduo é filtrado e lavado com uma mistura dioxano:água (9/1,v/v). Tal como no método original, o filtrado e o extracto foram concentrados no evaporador rotativo, tendo sido a lenhina precipitada por adição do extracto concentrado a uma grande quantidade de água destilada fria sob agitação vigorosa. O precipitado foi separado por centrifugação e lavado com água destilada até pH neutro.

A lenhina isolada pelos dois métodos foi liofilizada e quantificada gravimetricamente.

De uma forma geral, as lenhinas serão designadas por LD+ Iniciais das Partes Morfológicas (por exemplo, **LD_{NP}** – Lenhina Dioxano das Nervuras/Pecíolos; **LD_L** - Lenhina Dioxano dos Limbos; **LD_{TF}** - Lenhina Dioxano do Talo Floral; **LD_{BF}** - Lenhina Dioxano das Bainhas Foliares e **LD_R** - Lenhina Dioxano do Ráquis).

3.6.2. PURIFICAÇÃO DA LENHINA

As lenhinas obtidas foram purificadas por dois métodos: *i)* por solubilização em 1,2-dicloroetano/etanol (2/1, v/v) e precipitação em éter etílico (Método 1) [134] e *ii)* por solubilização numa mistura de dioxano/metanol (9/1, v/v) seguida de precipitação em água (Método 2). Em cada um dos casos, o sobrenadante foi recolhido por centrifugação e o resíduo foi submetido a mais duas etapas de solubilização com novas porções de solvente. Em cada método, os sobrenadantes foram misturados e precipitados numa grande quantidade de éter etílico ou água destilada sob agitação vigorosa, consoante seja o método 1 ou 2, respectivamente. A lenhina purificada foi centrifugada e seca por liofilização. A percentagem de lenhina dioxano purificada foi determinada gravimetricamente.

3.6.3. EXTRACÇÃO DA LENHINA COM CLOROFÓRMIO

Devido à identificação de compostos alifáticos nas lenhinas purificadas pelo Método 2, estas foram submetidas a três lavagens sucessivas com clorofórmio, sob agitação, à temperatura ambiente durante 24h [165]. Entre cada extracção, a mistura foi filtrada, sendo o extracto em clorofórmio recolhido e a lenhina submetida a extracção com uma nova porção de solvente. A lenhina foi filtrada e os extractos em clorofórmio foram recolhidos, concentrados e secos sob vácuo. Determinou-se gravimetricamente a percentagem de lenhina dioxano extraída com clorofórmio.

Os extractos em clorofórmio foram analisados por GC-MS, após hidrólise alcalina (secção 3.4.2), de acordo com o procedimento descrito em 3.4.3. O padrão interno utilizado foi o ácido succínico.

3.6.4. ANÁLISE PRELIMINAR DAS LENHINAS

Cinzas. O teor de cinzas foi determinado por análise termogravimétrica (TGA) conforme descrito na secção 3.5.1.

Polissacarídeos. O teor de açúcares existente nas lenhinas isoladas foi determinado com base no método de análise de açúcares neutros descrito em 3.3.14.

Grupos Metoxilo. A percentagem de grupos metoxilo da lenhina foi determinada com base no método de Zeisel modificado [166]. Num balão de 50 mL, foram adicionados a cerca de 20 mg de lenhina, 0,5g de fenol, 1g de KI e 2 mL de H₃PO₄ a 85%. O iodeto de metilo gerado a partir da amostra, a 145°C durante 40 minutos, foi arrastado para uma

solução de Br₂ por uma corrente de azoto de fluxo controlado e através de um condensador com fluxo de água aquecida a 50°C. O Br₂ foi retirado do sistema de recolha e arrastado com uma solução de acetato de sódio. Após uma adição cuidadosa de ácido fórmico a 4%, ácido sulfúrico a 10% e KI a 10%, o iodato de metilo formado foi titulado com uma solução padronizada de tiosulfato de sódio a 0,1M. Foram realizadas duas determinações para cada amostra.

Análise Elementar. As amostras de lenhina foram secas sob vácuo e submetidas a análise elementar, num aparelho LECO, CHNS-932.

3.6.5. CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DA LENHINA

3.6.5.1. ESPECTROSCOPIA DE FTIR

As lenhinas foram caracterizadas por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier - FTIR. Para tal, as amostras foram previamente secas num forno Büchi B-580 sob vácuo durante pelo menos 4 horas. Os espectros de FTIR foram efectuados num espectrómetro Nicolet® AVATAR 360 FTIR *esp* e traçados em pastilhas de KBr (1mg de amostra para 250 mg de KBr).

3.6.5.2. Espectroscopia de RMN

RMN de ¹³C do estado sólido. Os espectros de RMN de ¹³C CP/MAS RMN das lenhinas foram adquiridos nas mesmas condições referidas em 3.3.2.

RMN de ¹H. Os espectros de RMN de ¹H das lenhinas acetiladas foram registados num espectrómetro de RMN FT BRUKER AMX 300 à temperatura ambiente. A lenhina acetilada foi dissolvida em clorofórmio-d¹ (numa concentração de aproximadamente 5%) contendo tetrametilsilano como referência interna. O número de pulsos de 90° aplicados foi de 200 a 250 com duração de 12 µs e um intervalo entre pulsos de 2s.

Acetilação da lenhina. A cerca de 20 mg de lenhina adicionaram-se 0,1 mL de anidrido acético/piridina (4,7/4,0, v/v) e a mistura foi mantida a 42°C durante 24 horas. Adicionou-se 1 mL de metanol e 8 mL de diclorometano e, após 30 minutos, adicionaram-se 5 mL de HCl a 7%, removendo-se em seguida a fase aquosa. Esta lavagem com solução de ácido clorídrico foi realizada mais duas vezes e foi seguida de lavagem com água. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e evaporada até à secura.

RMN de ^{13}C quantitativo. Os espectros de RMN de ^{13}C quantitativo foram obtidos usando o espectrómetro de RMN FT BRUKER AMX 300, operando na frequência de carbono de 75.5 MHz. As amostras de lenhina foram dissolvidas em DMSO- d^6 (concentração aproximada de 25%), colocadas em tubos de 5 mm de diâmetro. Os espectros foram adquiridos a 318 K usando tetrametilsilano como referência interna e com pulsos de 90° em intervalos de 12s e 18000 scans.

3.6.5.3. PY-GC/MS

A Pirólise acoplada à Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massa (Py-GC/MS) é uma técnica de análise muito útil na caracterização da lenhina. Esta técnica para além de apresentar várias vantagens como: *i*) a simplicidade de preparação da amostra, *ii*) tempos de análise rápidos e *iii*) exigir pequenas quantidades de amostra (1 a 100 μg), pode ser aplicada directamente aos materiais lenhocelulósicos, eliminando a necessidade de isolamento da lenhina [167]. Sob condições apropriadas, a lenhina é termicamente degradada originando uma mistura de fenóis relativamente simples, resultantes da clivagem das ligações éter e C-C interunidades. Os fenóis metoxilados libertados retêm os padrões de substituição dos diferentes monómeros da lenhina, sendo por isso possível identificar os componentes derivados das unidades H, G e S e classificar por conseguinte a lenhina de acordo com a sua razão H/G/S [167,168].

Dadas as suas vantagens e informação obtida, por uma questão de tempo e de disponibilidade do equipamento, esta técnica foi apenas aplicada às lenhinas de Björkman, as quais devido à quantidade limitada de amostra obtida, não puderam ser caracterizadas estruturalmente por outras técnicas e métodos.

Análise por Py-GC/MS. A análise das lenhinas de Björkman foi efectuada num pirolisador de resistência *Pyroprobe 1000* da CDS Analytical Inc., equipado com um filamento helicoidal de platina, acoplado a um cromatógrafo Trace Gas Chromatograph 2000 Series com um espectrómetro de massa Finnigan Trace MS (GC-MS). No centro do filamento helicoidal foi colocado um tubo de quartzo, contendo cerca de 100 μg de lenhina. A temperatura de pirólise foi de 550°C , com a interface a 250°C , a velocidade de aquecimento de $1^\circ\text{C}/\text{ms}$ e o tempo de pirólise de 10 s. Os produtos de pirólise foram introduzidos na coluna cromatográfica usando hélio como gás de arraste.

A análise por GC-MS foi efectuada usando uma coluna capilar DB-5 J&W (30 m × 0,25 mm i.d., com 0,15 µm de espessura de filme). As condições cromatográficas foram as seguintes: temperatura inicial 45°C (4 min), gradiente de temperatura 3°C/min até os 213°C, e 30°C/min até à temperatura final de 300°C (5 min), temperatura do injector 250°C e a do detector 300°C.

Os vários componentes presentes no pirograma foram identificados com base em dados espectrais existentes na literatura [167,169-173], assim como por comparação dos seus espectros de massa com a biblioteca Wiley-Nist.

3.6.5.4. Oxidação com Nitrobenzeno

A oxidação de lenhinas com nitrobenzeno em meio alcalino foi introduzida em 1939 por Freudenberg e outros [174]. A determinação qualitativa e quantitativa dos produtos resultantes da oxidação com nitrobenzeno fornece informação acerca das quantidades mínimas e as quantidades relativas das unidades H, G e S não condensadas presentes na lenhina [174,175]. Além de ser um método simples, pode ser aplicado quer à lenhina isolada quer directamente ao material para análise da lenhina *in situ* [174,176].

A oxidação com nitrobenzeno foi realizada segundo o método descrito na literatura [174] com algumas alterações pontuais: ao material extraído, antes e após hidrólise alcalina, (100 mg) foram adicionados 7 mL de NaOH a 2 M em microdigestores de capacidade 20 mL e 0,45 mL de nitrobenzeno. Após 3 horas a 170°C com agitação de hora a hora, o microdigestor foi arrefecido e a mistura transferida quantitativamente para uma ampola de decantação e extraída com clorofórmio (3 × 40 mL) para retirar o nitrobenzeno remanescente. A fase aquosa foi acidificada até pH 2, tendo-se repetido a extracção com clorofórmio (3 × 40 mL). A fase orgânica foi seca através de sulfato de sódio anidro e evaporada até à secura. Os produtos de oxidação foram derivatizados por sililação de acordo com o procedimento descrito na Secção 3.4.3.

A quantificação dos produtos de oxidação foi efectuada utilizando para o efeito um cromatógrafo de gás Varian 3350, equipado com uma coluna capilar DB-5 J&W (30 m × 0,25 mm i.d., com 0,15 µm de espessura de filme) e detector FID, utilizando N₂ como gás de arraste (55 cm.s⁻¹). O programa de temperaturas foi o seguinte: temperatura do injector 230°C, temperatura inicial da coluna 130°C, gradiente de temperatura 5°C/min, temperatura final da coluna e temperatura do detector 270°C. A identificação dos produtos foi realizada

por GC-MS num cromatógrafo Trace Gas Chromatograph 2000 Series equipado com um espectrómetro de massa Finnigan Trace MS, usando hélio como gás de arraste (35 cm.s^{-1}) e a mesma coluna e programa de temperatura usados na quantificação.

3.6.5.5. Oxidação com Permanganato

A oxidação com permanganato envolve a degradação selectiva das cadeias laterais alifáticas ligadas às estruturas aromáticas da lenhina, resultando na formação de uma mistura complexa de ácidos carboxílicos aromáticos.

Este método de degradação química envolve quatro etapas. A primeira é a etilação de todos os grupos fenólicos livres, com protecção da estrutura fenólica de uma posterior oxidação. Num segundo passo, a degradação da cadeia lateral da unidade fenilpropanóide da lenhina é realizada com permanganato, obtendo-se além de ácidos carboxílicos, uma quantidade apreciável de ácidos fenilglioxílicos. Para conversão de todos os produtos de degradação intermediários em ácidos carboxílicos, é introduzida uma terceira etapa que consiste numa oxidação com peróxido de hidrogénio, em condições suaves. A última etapa envolve uma metilação com diazometano, que permite a obtenção de derivados adequados para a análise por GC/FID e GC-MS.

A oxidação com permanganato foi realizada com algumas alterações ao método descrito por Gellerstedt [177].

Etilação. A amostra (100 mg no caso do material de partida, e cerca de 50 mg para as lenhinas dioxano) foi dissolvida em 3,5 mL de metanol, 3,5 mL de 1,2-dimetoxietano e 3 mL de água, sob atmosfera de azoto e agitação constante. Posteriormente, adicionou-se 2 mL de dietilsulfato e durante 24 horas o pH da mistura foi mantido entre 11 e 13 por adições sucessivas de KOH a 15%. A reacção terminou com a adição de H_3PO_4 a 0,5 M até pH 3 e passados 30 minutos adicionou-se novamente KOH a 15% até pH 6,5. A mistura foi dissolvida numa mistura de álcool t-butilico/água (3/1, v/v) (40 mL) e evaporada até à secura.

Oxidação com Permanganato. Após a etilação, o resíduo seco foi re-dissolvido em 40 mL de álcool t-butilico/água (3/1,v/v) e colocado em banho de óleo a 85°C . Adicionaram-se pela ordem apresentada os seguintes reagentes: 40 mL de NaOH a 0,5 M,

100 mL de NaIO_4 a 0,06 M e 20 mL de KMnO_4 a 0,03 M, deixando-se reagir durante 6 horas. Durante este período, para assegurar uma concentração constante de permanganato na mistura, foram adicionados 200 mg de KMnO_4 e 1,28 g de NaIO_4 , sempre que a mistura adquiria uma tonalidade acastanhada. A reacção foi terminada por adição de 10 mL de etanol. Após arrefecimento, a suspensão foi filtrada por um cadinho filtrante de porosidade 4 contendo sílica de 70-230 mesh, previamente lavada. O resíduo foi lavado com um pouco de NaHCO_3 a 1% e ajustou-se o pH do filtrado a 6,2 com H_2SO_4 a 9 M. O filtrado foi evaporado até um volume final de cerca de 100 mL.

Oxidação com peróxido de hidrogénio. A mistura obtida anteriormente foi colocada num banho de óleo a 50°C e adicionaram-se 0,25 mL de ácido dietilenotriaminopentacético (DTPA) a 0,3% e com pH 7, 20 mL de uma mistura álcool t-butilico/água (1/1, v/v), 0,9 g de Na_2CO_3 e 5 mL de H_2O_2 a 30%. Deixou-se reagir durante 10 minutos e terminou-se a reacção com adição de 100 mg de MnO_2 . Após cerca de 4 horas em repouso (de forma a garantir a destruição de todo o H_2O_2), a mistura foi filtrada por um cadinho filtrante de porosidade 4 e o pH do filtrado foi ajustado a 2 por adição de H_2SO_4 a 9 M. Após duas extracções com 100 mL e uma com 50 mL usando uma mistura de diclorometano/acetona (7/3, v/v), as fases orgânicas combinadas foram secas com Na_2SO_4 anidro e evaporadas até aproximadamente 1 mL.

Metilação com diazometano. A amostra anterior foi dissolvida em 5 mL de metanol e 15 mL de éter etílico, e adicionaram-se 100 μL de ácido piromelítico (padrão interno), de uma solução previamente preparada de 0,38g de ácido piromelítico em 20 mL de metanol. A esterificação dos ácidos carboxílicos foi efectuada com diazometano gerado a partir da N-metil-N-nitroso-p-toluenosulfonamida (DIAZALD) em meio alcalino e arrastado para a mistura através de uma corrente de azoto. A amostra permaneceu em diazometano durante cerca de 12 horas, após o que o diazometano foi removido com uma corrente de azoto e o solvente evaporado até à secura. O resíduo foi dissolvido em éter etílico e a amostra foi purificada por filtração através de uma pequena coluna de sílica de granulometria superior a 35 mesh. Após nova evaporação, os ácidos metilados foram dissolvidos em diclorometano.

Análise por GC-MS. Os produtos oxidados e metilados foram quantificados por GC, utilizando para o efeito um cromatógrafo de gás Varian 3350, equipado com uma coluna capilar DB-5 J&W (30 m × 0,25 mm i.d., com 0,15 µm de espessura de filme) e detector FID, utilizando N₂ como gás de arraste (55 cm.s⁻¹), com o seguinte programa de temperatura: temperatura do injector 230°C, temperatura inicial da coluna 150°C, gradiente de temperatura 5°C/min, temperatura final da coluna e temperatura do detector 270°C. A identificação dos produtos foi realizada por GC-MS num cromatógrafo Trace Gas Chromatograph 2000 Series acoplado a um espectrómetro de massa Finnigan Trace MS, usando hélio como gás de arraste (35 cm.s⁻¹), a mesma coluna e programa de temperatura usados na quantificação.

3.6.5.6. Cromatografia de Permeação em Gel

A análise por GPC foi realizada num aparelho PL-GPC 110 system (Polymer Laboratories Ltd., U.K.) equipado com uma pré-coluna Plgel 10 µm e uma coluna Plgel 10 µm MIXED D 300 × 7,5 mm e detector de índice de refração. O sistema de injeção e as colunas foram mantidos a 70°C. As soluções de lenhina (4%) foram preparadas imediatamente antes da análise por dissolução em LiCl a 0,5% em DMF. O fluxo de eluente (LiCl a 0,5% em DMF) foi de 0,9 mL/min. A calibração foi realizada utilizando amostras de lenhina cujo peso molecular médio foi previamente determinado por ESI-MS [178].

4. DISCUSSÃO DE RESULTADOS

4.1. CARACTERIZAÇÃO DAS VÁRIAS PARTES MORFOLÓGICAS DA BANANEIRA

De forma a caracterizar as várias partes morfológicas da bananeira ‘Dwarf Cavendish’ utilizadas ao longo de todo o trabalho foi efectuado numa primeira abordagem uma caracterização dos componentes do material de partida *in situ* utilizando técnicas espectroscópicas do estado sólido (RMN de ^{13}C e FTIR-ATR) e por fim, o estudo da composição química através do uso de métodos de fraccionamento e de quantificação gravimétrica convencionais.

4.1.1. ESPECTROSCOPIAS DE FTIR E DE RMN CP/MAS DE ^{13}C

As técnicas espectroscópicas de infravermelho e de RMN de ^{13}C do estado sólido têm sido extensivamente usadas na caracterização de materiais lenhocelulósicos. Nas Figuras 4.1 e 4.2 apresentam-se os espectros de FTIR-ATR e de RMN CP/MAS de ^{13}C das diferentes partes morfológicas da bananeira com (1) e sem (2) extractáveis. As atribuições que foram feitas com base em estudos já existentes na literatura [83,84,97,179-199] encontram-se sumarizadas nas Tabelas 4.1 e 4.2.

Comparando os espectros de FTIR-ATR e de RMN CP/MAS de ^{13}C , das várias partes morfológicas, é possível verificar que existem algumas diferenças entre as amostras em estudo.

De entre os vários materiais com extractáveis, o espectro de FTIR-ATR dos limbos é o que mais difere dos restantes. No seu espectro, a presença dos dois picos muito intensos a 2918 e 2850 cm^{-1} e da banda a 1732 cm^{-1} , sugere a presença de quantidades superiores de **compostos alifáticos**, tais como extractáveis e/ou compostos poliméricos tipo suberina e/ou cutina, relativamente às restantes fracções. Esta observação é confirmada pelo respectivo espectro de RMN de ^{13}C dos limbos (Figura 4.2.1b), no qual os sinais na região alifática (24-54 ppm) se encontram mais intensos relativamente às restantes partes.

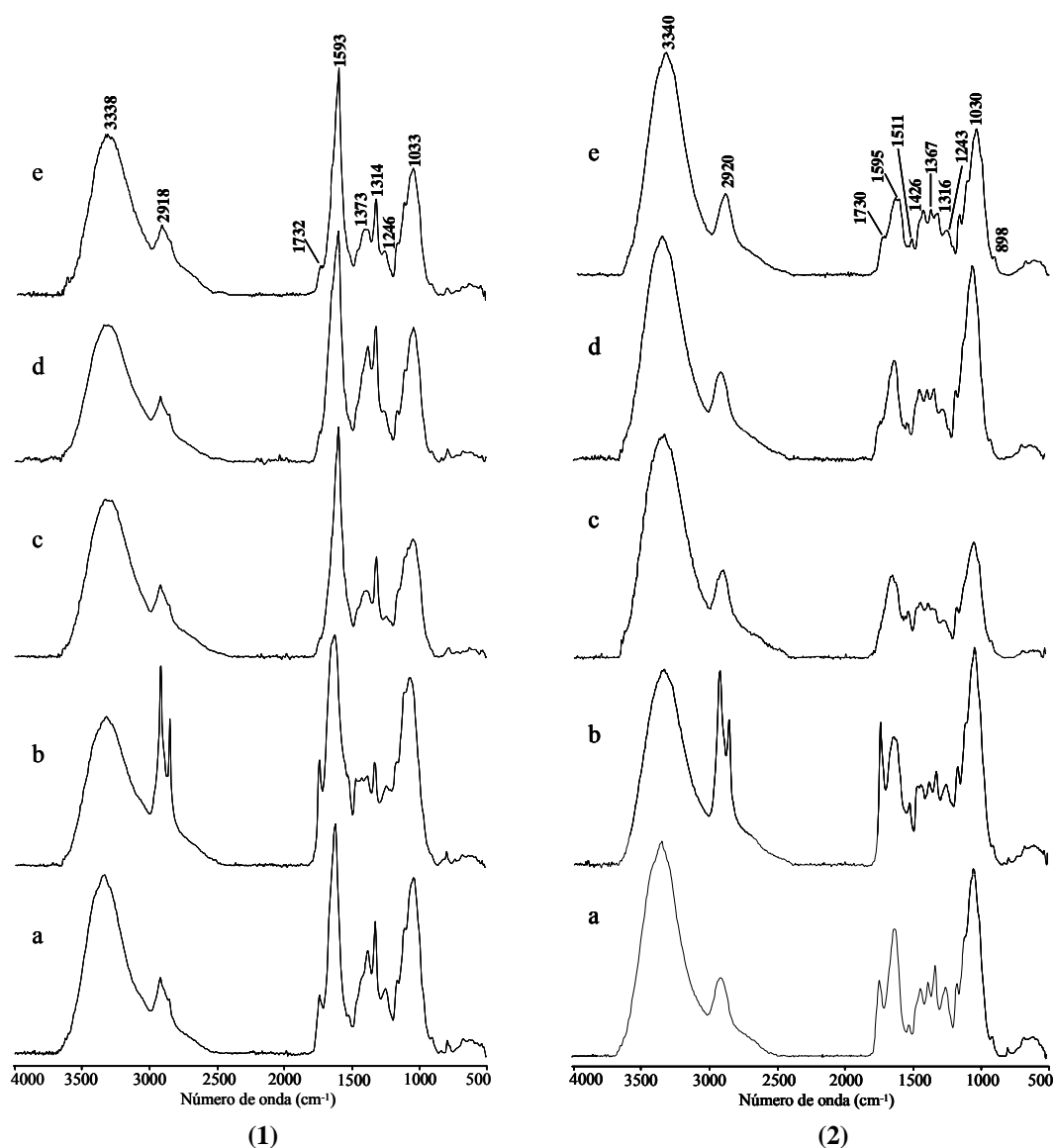


Figura 4.1. Espectros de FTIR-ATR das várias partes morfológicas da ‘Dwarf Cavendish’ antes (1) e após (2) extração com diclorometano, etanol/tolueno e água: (a) Nervuras/pecíolos, (b) Limbos, (c) Talo floral, (d) Bainhas foliares e (e) Ráquis.

Comparando os espectros de FTIR-ATR e de RMN de ^{13}C antes e após a extração, é possível verificar que na maioria das partes morfológicas, os sinais atribuídos aos compostos alifáticos diminuem significativamente de intensidade. Contudo, nos espectros dos limbos (2b) nas Figuras 4.1 e 4.2, embora em menor quantidade, os compostos alifáticos continuam presentes, indicando que a extração não foi completa e/ou que estes se encontram ligados covalentemente aos componentes estruturais, tal como sucede com os compostos poliméricos do tipo suberina e/ou cutina [83].

Tabela 4.1. Atribuições das absorções vibracionais de FTIR das várias partes morfológicas da bananeira, com base em estudos prévios [84,120,191,194,197].

Frequência (cm ⁻¹)	Grupo Funcional	Atribuição
3338	OH alongação	extractáveis, polissacarídeos, lenhina
2918	CH alongação assimétrica (CH ₂ alifático)	extractáveis, polissacarídeos, lenhina
2850	CH alongação simétrica (CH ₂ alifático)	extractáveis, polissacarídeos, lenhina
1732	C=O alongação (ésteres)	extractáveis, polissacarídeos, lenhina
1593	C=C alongação (aromático)	extractáveis, lenhina
1511	C=C alongação (aromático)	extractáveis, lenhina
1456	CH deformação assimétrica	extractáveis, polissacarídeos, lenhina
1426	CH deformação	extractáveis, polissacarídeos, lenhina
1373	CH deformação simétrica	extractáveis, polissacarídeos
1314	C _{aril} -O alongação	lenhina
1246	CO alongação	polissacarídeos, lenhina
1159	C-O alongação assimétrica	extractáveis, polissacarídeos, lenhina
1098	CH, CO deformação	polissacarídeos, lenhina
1033	CH, CO deformação	polissacarídeos, lenhina
898	CH deformação	polissacarídeos

Outros sinais presentes nos espectros de FTIR-ATR e RMN de ¹³C no estado sólido são os atribuídos à **lenhina**. Contudo, dada a fraca intensidade dos sinais na região entre 110-160 ppm (Figura 4.2), atribuídos aos carbonos insaturados e aromáticos da mesma, não é possível inferir acerca do tipo de unidades constituintes da lenhina das várias fracções através dos seus espectros de RMN de ¹³C do estado sólido. Apesar da baixa intensidade poder indicar um baixo teor de lenhina existente na planta em estudo, estes sinais são mais visíveis no espectro dos limbos (Figura 4.1.1b), sugerindo um teor mais elevado de lenhina nesta fracção. Paralelamente, o sinal a 56 ppm, que provém essencialmente dos grupos metoxilo da lenhina, ao contrário das restantes partes morfológicas, não é visível nos espectros do talo floral e do ráquis (Figura 4.2.1c e 1e, respectivamente), o que sugere que estas duas partes morfológicas deverão apresentar teores de lenhina inferiores às restantes partes em estudo. Após o processo de extracção, este sinal não surge no espectro das bainhas foliares (Figura 4.2.2d) o que leva a crer que esta parte morfológica deverá apresentar também um baixo conteúdo em lenhina.

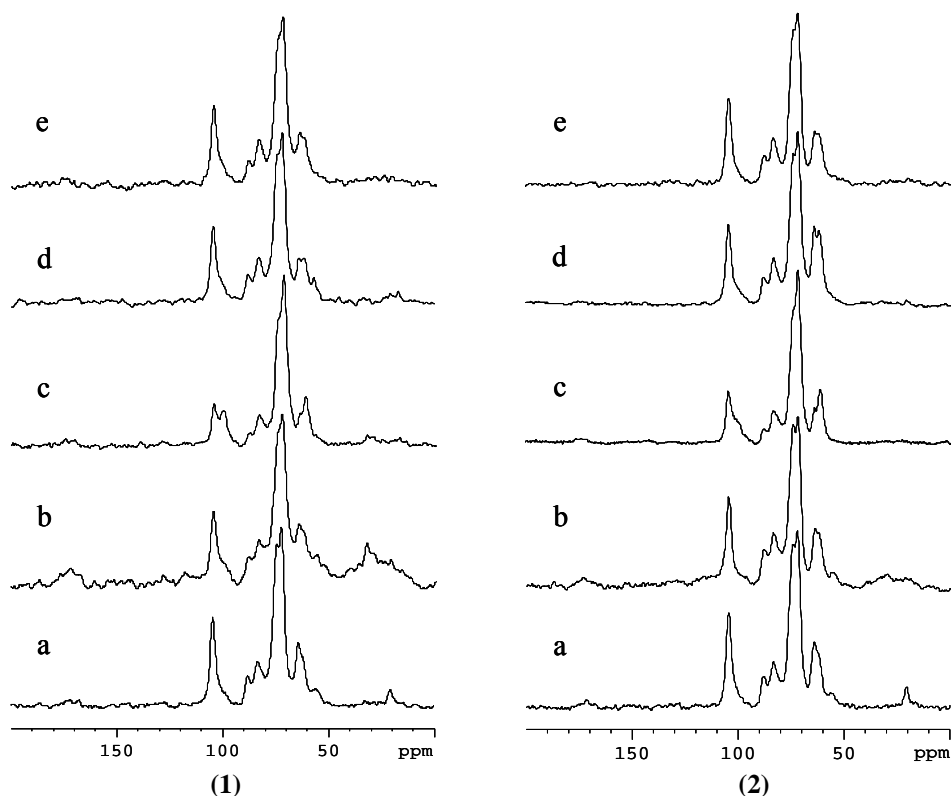


Figura 4.2. Espectros de RMN CP/MAS de ^{13}C das várias partes morfológicas da ‘Dwarf Cavendish’ antes (1) e após (2) extracção com diclorometano, etanol/tolueno e água: (a) Nervuras/pecíolos, (b) Limbos, (c) Talo floral, (d) Bainhas foliares e (e) Ráquis.

Ao contrário dos espectros de RMN de ^{13}C no estado sólido, nos espectros de FTIR-ATR (Figura 4.1) as bandas atribuídas à lenhina são mais visíveis ($1600\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$), pelo que é possível tirar alguma informação adicional acerca do tipo de unidades monoméricas que a constituem. Contudo, a análise da lenhina no material com extractáveis poderá vir alterada devido à presença de outros componentes fenólicos, como é o caso dos taninos, que apresentam absorções nesta mesma região, nomeadamente por volta dos 1607 e $1300\text{--}1460\text{ cm}^{-1}$. De facto, a sua presença parece ser confirmada com o processo de extracção, após o qual se verifica uma diminuição acentuada da intensidade das bandas a 1593 cm^{-1} e 1314 cm^{-1} , atribuídas à elongação $\text{C}=\text{C}$ aromática e $\text{C}_{\text{aril}}\text{-O}$, respectivamente (Figura 4.1.2), que sugere a extracção de uma quantidade considerável de compostos aromáticos do tipo taninos ou fragmentos de lenhina.

Tabela 4.2. Atribuição dos sinais de RMN de ^{13}C do estado sólido nas várias partes morfológicas da bananeira ‘Dwarf Cavendish’, com base em estudos prévios [83,84,97,179-199].

δ (ppm)	Componente
21	$\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{COO-}$, hemiceluloses
24-54	$-(\text{CH}_2)_n-$, extractáveis, cutina
56	Ar-OCH ₃ lenhina; -OCH ₃ hemicelulose
61-63	C6, celulose amorfa; hemicelulose; C γ -OH, C β -OAr, lenhina
64	C6, celulose cristalina
72	C2,C3,C5, celulose e hemicelulose; C α , lenhina
75	C2,C3,C5, celulose e hemiceluloses; C γ -OR, C β -OR, lenhina
83.4	C4, celulose amorfa; amido, hemiceluloses, C β , lenhina
87.5	C4, celulose cristalina; C β -OR, C α -OR, lenhina
100	C1, amido
105	C1, celulose; G2,S2,S6, lenhina
114	S2,S6,G5, lenhina
122	G6, C β , lenhina
131	C quaternário, S1, S4, G1 lenhina
145	C quaternário, extractáveis (taninos)
148	C quaternário, G3,G4, S3,S5 lenhina
152	C quaternário, S3,S5, lenhina
167	-COOR-, ácidos fenólicos
173	$\underline{\text{C}}\text{OO-R}$, $\text{CH}_3\text{-}\underline{\text{C}}\text{OO-}$, hemiceluloses
177	$\underline{\text{C}}\text{OOH}$, hemiceluloses (ácidos urónicos), ácidos fenólicos

Por conseguinte, relativamente ao material sem extractáveis, as bandas atribuídas à lenhina tornaram-se mais visíveis, em especial as absorções devidas às unidades G (1511 e 1456 cm^{-1}), as quais passaram a ser observáveis, inclusivé, no espectro das bainhas foliares (Figura 4.1.2d). Embora com menor intensidade comparativamente ao material inicial (Figura 4.1.1), a banda a 1316 cm^{-1} , sugere que a fracção aromática do material extraído é rica em unidades S, nomeadamente as bainhas foliares e o ráquis, cuja intensidade é superior à da banda a 1456 cm^{-1} , associada às unidades G.

Relativamente aos **polissacarídeos**, por análise dos espectros de FTIR-ATR (1200-950 cm^{-1}) e de RMN de ^{13}C no estado sólido (60-105 ppm) (Figuras 4.1 e 4.2), conclui-se que constituem um componente maioritário das várias fracções em estudo.

Nos espectros de FTIR-ATR, após o processo de extracção, é possível verificar uma ligeira alteração da intensidade relativa das absorções típicas deste tipo de compostos a 1159, 1098 e 1033 cm^{-1} (Figura 4.1.2), relativamente à dos espectros do material com extractáveis (Figura 4.1.1). O ligeiro aumento da intensidade do ombro a 1159 cm^{-1} e diminuição da absorção a 1098 cm^{-1} , parece sugerir que durante o processo de extracção foi removida uma fracção de açúcares livres, o que pode ser facilmente explicado pela sua solubilidade em água. O aumento verificado na intensidade relativa dos sinais 61 e 64 ppm, quando comparada com a dos outros sinais na região 72-104 ppm, nos espectros de RMN de ^{13}C no estado sólido, antes e após o processo de extracção (Figura 4.2), corrobora esta hipótese.

A técnica de RMN de ^{13}C de estado sólido permitiu a identificação de um sinal intenso a cerca dos 100 ppm no espectro do talo floral, atribuído ao C1 do amido (Figura 4.2.1c) [194,198]. A intensidade deste sinal, após o processo de extracção, diminuiu ligeiramente, sugerindo que tal como os açúcares livres, uma fracção deste biopolímero deverá ter sido removido durante a extracção exhaustiva com água.

A presença de hemiceluloses no material é confirmada pelo sinal a 21 ppm, que é mais intenso nas nervuras/pecíolos (Figura 4.2.1a), e pelos sinais a 171 e 177 ppm, que são observados essencialmente nos limbos (Figura 4.2.1b) e que indicam a presença de grupos acetilo nas hemiceluloses e grupos carboxilos de ácidos urónicos, respectivamente. No material extraído, estes sinais continuam visíveis, sendo a sua presença mais notória nestas partes morfológicas (Figura 4.2.2a e 2b).

O sinal a 167 ppm, observado em especial no espectro dos limbos (Figura 4.2.1b), pode ser atribuído a grupos éster alifáticos presentes em compostos como a cutina e/ou suberina. A presença deste tipo de compostos nos limbos não é surpreendente, visto que estes biopolímeros encontram-se normalmente nas folhas de certas plantas, nos frutos e em determinadas árvores, como é o caso do *Quercus suber* L [83,84]. É de referir que, no caso dos limbos, os sinais entre 160-180 ppm diminuíram ligeiramente de intensidade com a extracção, o que sugere que uma fracção deste tipo de compostos foi removida durante este processo.

4.1.2. COMPOSIÇÃO QUÍMICA

A elucidação da composição química das várias partes morfológicas (nervuras/pecíolos, limbos, talo floral, bainhas foliares e ráquis) da bananeira ‘Dwarf Cavendish’ é o ponto de partida para um melhor conhecimento das cinco fracções, já que a informação existente na literatura é relativamente escassa.

Antes da análise química detalhada, foi realizada uma determinação do teor em água dos tecidos vegetais em estudo. Os resultados obtidos para as diversas partes morfológicas (Tabela 4.3) mostram que apenas 9 a 25% do peso inicial das respectivas partes morfológicas corresponde a matéria seca.

Tabela 4.3. Teor de água (%) em cada parte morfológica em estudo.

Amostra	Água (%)
Nervuras/Pecíolos	89,0
Limbos	74,3
Talo floral	92,9
Bainhas foliares	91,7
Ráquis	93,5

De entre as várias fracções em estudo, o ráquis é a que apresenta uma percentagem mais elevada de água (93,5%), à semelhança do que é referido por outros autores [2]. Embora o teor de água dos limbos também seja elevado (74,3%), esta parte morfológica é a que apresenta um valor mais baixo.

De referir que, com excepção dos limbos, as restantes partes morfológicas desempenham funções de armazenamento e/ou transporte de água e de nutrientes, apresentando consequentemente nos seus tecidos uma elevada percentagem de água.

Na Tabela 4.4 é apresentada a quantificação global dos componentes extraídos das diferentes regiões morfológicas da ‘Dwarf Cavendish’.

Tabela 4.4. Composição química das diferentes regiões morfológicas da ‘Dwarf Cavendish’ (% relativa ao material seco com extractáveis).

Parâmetro	Nervuras/Pecíolos	Limbos	Talo Floral	Bainhas Foliaves	Ráquis
Cinzas					
Material inicial	11,6	19,4	26,1	19,0	26,8
Material extraído	4,8	7,3	1,3	1,6	0,7
Extractáveis^a	5,9	16,1	17,6	12,6	17,6
Diclorometano	1,2	5,8	1,4	1,4	1,5
Etanol/Tolueno	0,9	2,6	1,1	2,1	1,4
Água	3,8	7,7	15,1	9,1	14,7
Proteínas					
Material inicial	3,7	10,1	5,3	3,8	5,6
Material extraído	1,6	8,3	3,2	1,9	2,0
Lenhina de Klason^a	18,0	24,3	10,7	13,3	10,5
Insolúvel	16,8	22,0	9,8	12,6	9,6
Solúvel	1,2	2,3	0,9	0,7	0,9
Holocelulose^b	62,7	32,1	20,3	49,7	37,9
Hemicelulose A ^a	14,8	6,7	2,8	7,2	3,9
Hemicelulose B ^a	6,7	1,9	2,7	4,2	3,6
α -Celulose ^a	39,5	20,7	14,4	37,1	28,4
Amido					
Material inicial	0,4	1,1	26,3	8,4	1,4
Material extraído	n.d.	n.d.	20,2	2,8	0,8
Celulose Kürschner-Höffner ^c	31,0	20,4	15,7	37,3	31,0
Pentosanases	16,2	12,1	8,0	12,4	8,3

^a Corrigido para o teor em cinzas^b Corrigido para o teor em cinzas, lenhina de Klason e amido^c Corrigido para o teor em cinzas, lenhina de Klason e pentosanases

n.d. – não detectado

4.1.2.1. Cinzas

O teor de cinzas das cinco partes morfológicas em estudo varia entre os 11,6% nas nervuras/pecíolos e os 26,8% no ráquis. Apesar dos teores de cinzas nas nervuras/pecíolos, nos limbos e nas bainhas foliares serem semelhantes aos valores apresentados por outras monocotiledóneas [43,44], as percentagens obtidas para o talo floral e o ráquis (cerca de 27%) são consideravelmente mais elevados.

Os teores de cinzas obtidos para as bainhas foliares e para o ráquis são semelhantes aos apresentados por outros autores para as mesmas regiões morfológicas da bananeira (13,9 e 22,8%, respectivamente) [21,38].

Contrariamente ao material com extractáveis, o material extraído apresentou teores muito inferiores de cinzas (1-8%), o que resulta da remoção de uma fracção considerável do material inorgânico (cerca de 55 a 96%) durante o processo de extracção com água.

A análise elementar das cinzas revela a presença de diferentes constituintes (Tabela 4.5), sendo os maioritários o potássio, o cálcio e o silício.

Tabela 4.5. Composição dos elementos minerais das cinzas obtidas nas diferentes partes da ‘Dwarf Cavendish’ (% m elemento/m cinzas).

Elementos	Nervuras/Pecíolos	Limbos	Talo Floral	Bainhas Foliaves	Ráquis
Si	7,0	24,9	7,8	2,7	1,2
Ca	32,3	8,0	0,6	5,5	0,6
K	9,4	11,6	23,1	21,4	28,0
P	0,7	0,7	0,7	0,9	1,7
Mg	2,9	1,1	0,5	1,9	0,3

A presença de grandes quantidades de potássio nas cinzas das bainhas foliaves e do talo floral está de acordo com o obtido por outros autores [11,24]. Para além destas partes, é de realçar que o potássio é o elemento maioritário no ráquis, enquanto que nas nervuras/pecíolos predomina o cálcio e nos limbos o silício. A presença de silício em todas as partes morfológicas, nomeadamente nas nervuras/pecíolos, limbos e talo floral sugere que, tal como sucede nas gramíneas, deverão existir grandes quantidades de sílica (SiO_2) na planta em estudo [45].

4.1.2.2. Extractáveis

Com o objectivo de quantificar selectivamente compostos de baixo peso molecular com diferentes polaridades, foram realizadas extracções consecutivas das várias partes com diclorometano, etanol/tolueno e água (Secção 3.3.5; Tabela 4.4).

Devido à elevada quantidade de compostos inorgânicos removidos durante o processo de extracção, as percentagens de extractáveis foram corrigidas para o teor de cinzas.

O teor total em extractáveis (6-18%) é semelhante ao apresentado por outras monocotiledóneas, como é o caso da *Arundo donax* [43], sendo o talo floral e o ráquis as partes que apresentam maior quantidade de extractáveis (ca. 18%). Embora na maioria das partes morfológicas, a quantidade total de extractáveis seja devida ao elevado teor em extractáveis em água (ca. 59 a 75% do total dos extractáveis), no caso dos limbos, o teor

em extractáveis de menor polaridade é mais representativo (52%). No caso particular dos limbos, o elevado teor de extractáveis em diclorometano (*ca.* 6%) vai de encontro ao constatado por FTIR-ATR e RMN de ^{13}C de estado sólido, nos quais esta parte morfológica apresentou uma abundância relevante de compostos alifáticos (Secção 4.1.1).

Durante o processo de extracção em água, como sugerido com base nas análises de FTIR-ATR e de RMN de ^{13}C de estado sólido, para além da remoção de compostos aromáticos e inorgânicos, pode também ter sido extraída uma fracção de hidratos de carbono. De forma a verificar a composição dos monossacarídeos extraídos durante este processo, foi efectuada a análise de açúcares neutros nos extractáveis em água que indicou a presença entre 6 a 33% de hidratos de carbono solúveis em água quente (Tabela 4.6).

Tabela 4.6. Composição sumária dos extractos em água das diferentes regiões morfológicas da ‘Dwarf Cavendish’ (% m/m: percentagem de cada componente no extracto em água).

Parâmetro		Nervuras/Pecíolos	Limbos	Talo Floral	Bainhas Foliare	Ráquis
Cinzas		68,1	42,7	56,1	49,2	63,9
Açúcares		14,9	16,0	14,1	33,3	6,4
Monossacarídeos	Ramnose	1,1	3,0	0,8	<0,1	0,3
	Fucose	<0,1	<0,1	<0,1	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	Arabinose	3,8	2,1	2,2	1,2	1,2
	Xilose	1,2	0,3	1,3	0,4	0,4
	Manose	1,5	0,5	0,6	1,9	0,6
	Galactose	3,6	3,3	2,9	1,5	1,9
	Glucose	3,7	6,8	6,3	28,3	1,9
Outros componentes		17,0	41,3	29,8	17,5	29,7

n.d. - não detectado

De entre os monossacarídeos extraídos, a glucose é o mais abundante na maioria das regiões morfológicas, nomeadamente nos limbos (42%), no talo floral (44%) e nas bainhas foliares (85%). O elevado teor em glucose no extracto em água do talo floral e das bainhas foliares pode ser explicado pela solubilização parcial do amido em meio aquoso, presente nestas regiões morfológicas (Tabela 4.4), o que está de acordo com o sugerido na Secção 4.1.1. A galactose é o segundo monossacarídeo mais abundante (4-30%), constituindo no caso do ráquis o monossacarídeo maioritário (30%). A presença de ramnose, em particular nos limbos, sugere a presença de algum material péctico nos extractos em água [200,201]. A fucose foi detectada apenas em quantidades vestigiais em todas as partes morfológicas.

Comparando os monossacarídeos presentes nos extractos em água das fracções em estudo com os obtidos em outras monocotiledóneas, verifica-se que apresentam algumas

diferenças. O extracto em água quente das fibras da *Musa textilis*, mostrou ser constituído maioritariamente por xilose (31%) e glucose (48%) [97] enquanto que, por exemplo, da palha de trigo apresenta a galactose como o constituinte maioritário [202].

4.1.2.3. Proteínas

No presente trabalho, o teor de proteínas foi determinado no material com e sem extractáveis (Tabela 4.4). Após o processo de extracção com etanol/tolueno e água verifica-se que ocorre uma diminuição no teor de proteínas (*ca.* 2%). Este facto poderá dever-se à extracção de uma fracção proteica, assim como de metabolitos secundários contendo azoto, como por exemplo alcalóides, que contabilizam de igual forma para o teor de azoto orgânico total, inserindo por conseguinte um erro no cálculo do teor de proteínas [49].

De acordo com a Tabela 4.4, o teor de proteínas presente no material extraído das várias partes morfológicas da bananeira é baixo, com excepção dos limbos, que apresentam um valor mais elevado (8,3%).

A presença de material proteico em quantidades consideráveis nas plantas anuais pode inserir um erro na determinação gravimétrica da lenhina, devido à possível condensação de uma fracção de proteína com a lenhina, que co-precipita sob tratamento com ácido sulfúrico [43,45]. Atendendo aos teores de proteínas encontrados nas amostras em estudo e de forma a reduzir o teor desta interferência, o material lenhocelulósico foi submetido a um pré-tratamento com enzimas proteolíticas tais como a pepsina [134].

De forma a confirmar a influência das proteínas na determinação da lenhina de Klason, esta análise, para além de ter sido efectuada no material extraído foi também levada a cabo em amostras extraídas e posteriormente sujeitas a tratamento com pepsina. Os teores de lenhina de Klason obtidos após o tratamento com pepsina não diferiram significativamente das anteriores (*ca.* 1%), pelo que se optou por suprimir este passo na preparação do material vegetal destinado ao isolamento das lenhinas para caracterização estrutural.

4.1.2.4. LENHINA

Contrariamente ao que sucede com as madeiras, devido à presença de teores de sílica relevantes nas monocotiledóneas, a percentagem de lenhina insolúvel tem de ser corrigida

para o teor em cinzas. Os resíduos de lenhina das várias partes morfológicas apresentaram cerca de 2-13% de cinzas, valores estes que são próximos aos descritos neste tipo de plantas (5-10%) [134].

O conteúdo de lenhina obtido para as várias partes morfológicas (11-24%) insere-se dentro dos valores encontrados em outras plantas anuais [43-45]. Os limbos são a parte morfológica que apresenta a percentagem mais elevada de lenhina (24%), o que vai de encontro ao sugerido pela análise de FTIR-ATR e de RMN de ^{13}C (Secção 4.1.1).

4.1.2.5. Polissacarídeos

O constituinte maioritário das diversas partes morfológicas da bananeira em estudo é a holocelulose (32-63%), com excepção do talo floral, que apresenta como componente principal, o amido (26,3%). A maior abundância deste componente no talo floral está de acordo com o observado na análise por RMN CP/MAS de ^{13}C (Secção 4.1.1).

De modo a analisar de uma forma mais abrangente a fracção polissacarídica das várias partes morfológicas em estudo, foi efectuada a análise de açúcares neutros no material sem extractáveis, cujos resultados estão apresentados na Tabela 4.7.

Tabela 4.7. Composição média em monossacarídeos (% molar) do material sem extractáveis das diferentes partes morfológicas da ‘Dwarf Cavendish’.

Monossacarídeo	Nervuras/Pecíolos		Limbos		Talo Floral		Bainhas Foliaves		Ráquis	
	%(m/m)	%mol.	%(m/m)	%mol.	%(m/m)	%mol.	%(m/m)	%mol.	%(m/m)	%mol.
Ramnose	0,4	0,8	0,3	0,9	0,3	0,7	0,4	0,8	0,3	0,7
Arabinose	2,6	4,9	5,3	15,5	2,3	5,1	4,0	7,5	1,7	4,1
Xilose	12,4	23,6	6,0	17,5	4,2	9,3	7,3	13,8	5,8	14,0
Manose	0,8	1,5	0,8	2,3	1,0	2,2	0,8	1,5	1,2	2,9
Galactose	0,6	1,1	1,3	3,8	1,3	2,9	1,2	2,2	0,7	1,7
Glucose	35,8	68,1	20,5	60,0	36,0	79,8	39,4	74,2	31,8	76,6
Total	52,6	—	34,2	—	45,1	—	53,1	—	41,5	—

%(m/m): percentagem de cada monossacarídeo (forma anidra) no material de partida com extractáveis

% molar: percentagem molar de cada monossacarídeo (forma anidra) na base do material de partida com extractáveis

A glucose e a xilose são os açúcares maioritários presentes na planta, variando entre os 20-39% e os 4-12%, respectivamente. A arabinose constitui o terceiro monossacarídeo mais importante em todas as partes morfológicas, sendo os limbos a parte morfológica que apresenta um teor mais elevado deste monossacarídeo (5,3%).

Comparando os valores obtidos da análise de açúcares neutros no material sem extractáveis com os teores de holocelulose, verifica-se que, de um modo geral, os primeiros são superiores. Tendo em conta que os valores obtidos pelo método de análise de açúcares neutros deverão ser mais próximos dos valores reais, pelo facto de não envolver nenhum processo de isolamento, o valor mais baixo obtido na análise de açúcares neutros (na forma anidra) das nervuras/pecíolos parece sugerir que a holocelulose isolada pelo método do ácido peracético poderá estar contaminada por outros componentes, como por exemplo, substâncias pécicas ou ácidos urónicos.

No caso particular do talo floral, a diferença acentuada entre os valores da percentagem de holocelulose e dos açúcares neutros, justifica-se pela presença de amido nesta parte morfológica, pelo que se torna necessário somar ao teor de holocelulose o teor de amido presente no material sem extractáveis. Embora em menor extensão, o mesmo sucede com as bainhas foliares e o ráquis.

Relativamente ao teor de celulose de Küschner-Höffner nas amostras em estudo, apesar da percentagem nos limbos e no talo floral (16-20%) ser um pouco inferior ao apresentado por outras fibras de plantas anuais (28-60%) [44], os valores obtidos para as nervuras/pecíolos, as bainhas foliares e o ráquis encontram-se na gama de valores encontrados para este tipo de plantas. O teor de celulose obtido para as bainhas foliares (37,3%) é semelhante ao descrito na literatura por Cordeiro e outros [21] para a mesma parte morfológica.

Os resultados da análise das pentosanas indicam que as nervuras/pecíolos é a parte morfológica que apresenta o valor mais elevado (16%), seguida das bainhas foliares e dos limbos (12%). Os teores apresentados por estas partes morfológicas encontram-se na gama de valores existentes em determinadas madeiras, como é o caso do eucalipto [203]. Contrariamente, o talo floral e o ráquis apresentam valores de pentosanas mais baixos (8%). Comparando os resultados obtidos por este método com os obtidos da análise directa de monossacarídeos, verifica-se que os primeiros são ligeiramente superiores (*ca.* 2%). Este facto pode ser justificado tendo em conta que na determinação das pentosanas, podem ser contabilizados outros interferentes, como é o caso, por exemplo, de outras pentoses,

hexoses e mesmo ácidos urónicos presentes no material, que podem conduzir para a sobrevalorização do teor de pentosanas [203].

Uma outra forma de quantificação das hemiceluloses (hemiceluloses A e B), assim como da α -celulose, consiste no fraccionamento sucessivo da holocelulose com soluções alcalinas. Os resultados obtidos do fraccionamento da holocelulose indicam que: *i)* em geral, a maior fracção de hemiceluloses é facilmente extraída com a solução aquosa de KOH a 5% (hemicelulose A), representando cerca de 50-70% das hemiceluloses totais extraídas, *ii)* o rendimento das hemiceluloses (6 a 22%) é relativamente inferior ao obtido noutras plantas monocotiledóneas [43,45] e *iii)* o teor de α -celulose varia entre os 14 a 40%, sendo mais abundante nas nervuras/pecíolos, bainhas foliares e ráquis.

Com excepção das nervuras/pecíolos, nas restantes partes morfológicas os valores de α -celulose são semelhantes ou ligeiramente inferiores aos teores de celulose de Kürschner-Höffner, o que poderá dever-se a uma degradação e consequente dissolução parciais da celulose amorfa durante as extracções das hemiceluloses em meio alcalino [203].

Ao contrário do que sucede com as restantes partes morfológicas, no caso das nervuras/pecíolos, comparando o teor de α -celulose com a percentagem de glucose (na forma anidra) obtida na análise de açúcares neutros do material extraído, verifica-se que o primeiro é superior. Mais uma vez, como referido anteriormente, estes resultados sugerem que a holocelulose deverá estar contaminada por outros compostos, parte dos quais terá permanecido na α -celulose após o processo de fraccionamento. Atendendo às perdas de material inerentes ao processo de fraccionação, a soma dos valores de α -celulose e hemiceluloses é ligeiramente inferior à percentagem de holocelulose.

4.1.3. CONCLUSÃO

As várias partes morfológicas da bananeira ‘Dwarf Cavendish’ apresentam diferenças em termos de composição química. O constituinte maioritário das diversas partes morfológicas é a holocelulose (32-63%) com excepção para o talo floral que apresenta como componente maioritário o amido (26%). De entre as partes morfológicas com teor superior em celulose, destacam-se as bainhas foliares, as nervuras/pecíolos e o ráquis. Relativamente aos outros componentes, destacam-se os elevados teores de cinzas (12-27%) e de extractáveis (6-18%), em particular no talo floral e no ráquis. Na maioria das partes em estudo, os extractos em água representam cerca de 59-75% do total dos extractáveis, sendo os limbos os que apresentam um teor superior em extractáveis de menor polaridade (ca. 63%). O teor de proteínas, assim como de lenhina, é superior nos limbos o que contrasta com as restantes partes morfológicas, em particular com o talo floral, as bainhas foliares e o ráquis.

Dado o seu efeito negativo no cozimento [204,205], na recuperação de químicos e energia [206] e na qualidade e rendimento da pasta [207], a presença de elevadas percentagens de cinzas, assim como de extractáveis lipofílicos, poderá ser considerada como uma desvantagem na aplicação desta matéria-prima na produção de pasta e papel. Contudo, como a maior parte do material inorgânico e dos extractáveis é solúvel em água, de acordo com alguns estudos feitos com o ráquis da bananeira, a realização de um processo de “lavagem” do material, antes do processo de cozimento propriamente dito, mostra-se eficaz na redução deste tipo de compostos [2]. Atendendo à influência dos extractáveis lipofílicos na qualidade e rendimento de pasta, a composição química detalhada dos extractáveis lipofílicos das várias fracções é discutida no sub-capítulo 4.2.

Embora a percentagem de lenhina tenha influência no consumo de reagentes activos, esta, por si só, não determina a maior ou menor facilidade de deslenhificação do material. Sendo o conhecimento da sua estrutura fundamental na elucidação da capacidade de deslenhificação desta espécie, de forma a preencher esta lacuna, este trabalho dedica o sub-capítulo 4.4 ao estudo exaustivo da estrutura das lenhinas das várias fracções morfológicas. Contudo, numa análise preliminar, é de prever que devido ao baixo teor de lenhina no pseudo-tronco, assim como no ráquis, estas partes morfológicas tenham um especial interesse na produção de pasta e papel.

Os teores elevados de holocelulose e baixos de lenhina, assim como o valor da razão entre hemiceluloses e celulosas apresentados pelas bainhas foliares e ráquis, são promissores na produção de pasta e papel. Embora os teores de cinzas e extractáveis sejam elevados, o conteúdo em hidratos de carbono parece ser suficiente para possibilitar a utilização deste material na produção de pastas [2,21,121].

O conhecimento detalhado da composição dos extractáveis lipofílicos e da estrutura da lenhina, para além de poderem possibilitar um melhor aproveitamento destes resíduos através de uma melhoria dos rendimentos, bem como das propriedades mecânicas das pastas produzidas, poderão abrir novos horizontes de valorização para a ‘Dwarf Cavendish’.

4.2. EXTRACTÁVEIS LIPOFÍLICOS

Estudos relacionados com os extractáveis lipofílicos de algumas partes de plantas monocotiledóneas, como da palha de arroz, de trigo e de cevada [192,208-212], foram recentemente publicados. Os compostos identificados pertencem maioritariamente às famílias dos ácidos gordos, dos esteróis livres e esterificados, das ceras e dos diglicéridos [208,210].

No caso das musáceas, apesar dos trabalhos efectuados sobre a caracterização dos extractáveis lipofílicos serem, em geral, escassos, o grupo dos esteróis foi exaustivamente estudado em diferentes espécies de *Musa* [58-67,213].

Dada a importância do conhecimento da natureza deste tipo de compostos na aplicação dos materiais lenhocelulósicos em diversas áreas, nomeadamente na produção de pasta e papel, o isolamento e a caracterização dos extractáveis lipofílicos presentes na ‘Dwarf Cavendish’ torna-se fundamental devido: *i*) à influência que exercem na qualidade e propriedades das pastas produzidas, *ii*) aos custos acrescidos devido a um maior consumo de reagentes e *iii*) a problemas ambientais.

De forma a garantir uma extracção completa dos componentes lipofílicos, o solvente utilizado foi o diclorometano, o qual para além de ser um solvente com uma boa penetração em materiais lenhocelulósicos, apresenta uma elevada especificidade na extracção deste tipo de compostos. Devido aos riscos para a saúde e para o meio ambiente associados à utilização de solventes organoclorados, outros solventes, como a acetona, são aconselhados. Contudo, comparativamente ao diclorometano, a acetona é menos selectiva para os compostos em questão, pelo que, conjuntamente com os componentes lipofílicos, outros compostos mais polares nomeadamente fenóis, lenhanos e açúcares são extraídos, dificultando a quantificação gravimétrica bem como a análise cromatográfica da fracção lipofílica [214,215].

No presente trabalho, os extractos em diclorometano das diferentes partes morfológicas da ‘Dwarf Cavendish’ foram preparados e analisados por GC-MS antes e após hidrólise alcalina, de forma a analisar todos os compostos livres e esterificados existentes.

O teor de extractáveis em diclorometano (Figura 4.3) das diferentes partes morfológicas da bananeira ‘Dwarf Cavendish’ é semelhante (1,2-1,5%), com excepção dos limbos que apresentaram um valor consideravelmente superior (5,8%). Os valores obtidos para as fracções, nervuras/pecíolos, talo floral, bainhas foliares e ráquis, são semelhantes aos publicados em outras partes de plantas monocotiledóneas, tal como sucede com a palha de arroz, de trigo e cevada [208-211].

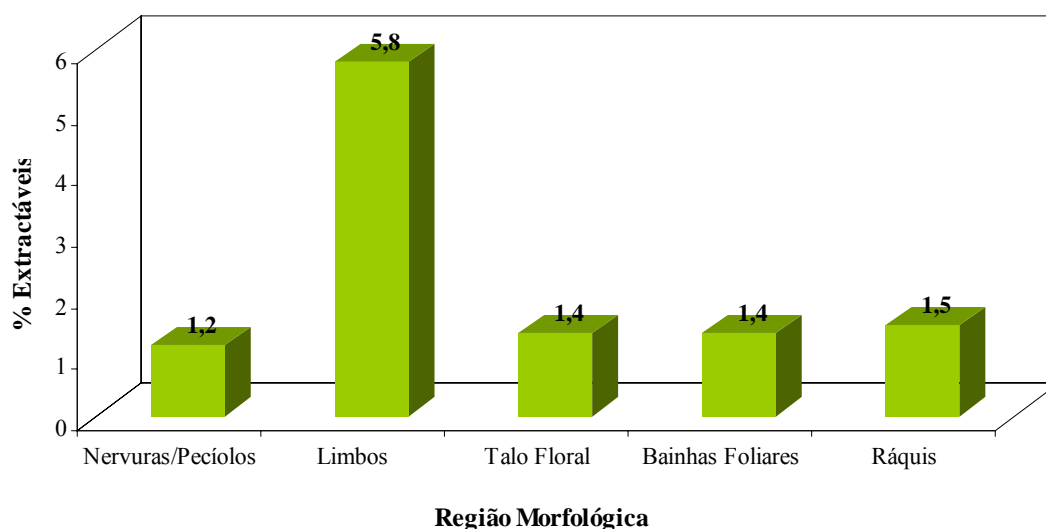


Figura 4.3. Teor de extractáveis em diclorometano obtido nas diferentes partes morfológicas da bananeira ‘Dwarf Cavendish’.

Apesar de qualitativamente a composição dos extractos em diclorometano das várias regiões da ‘Dwarf Cavendish’ ser semelhante, a abundância de certos compostos difere significativamente. A título de exemplo, os cromatogramas dos extractos derivatizados das bainhas foliares, antes e após hidrólise alcalina, são apresentados na Figura 4.4.

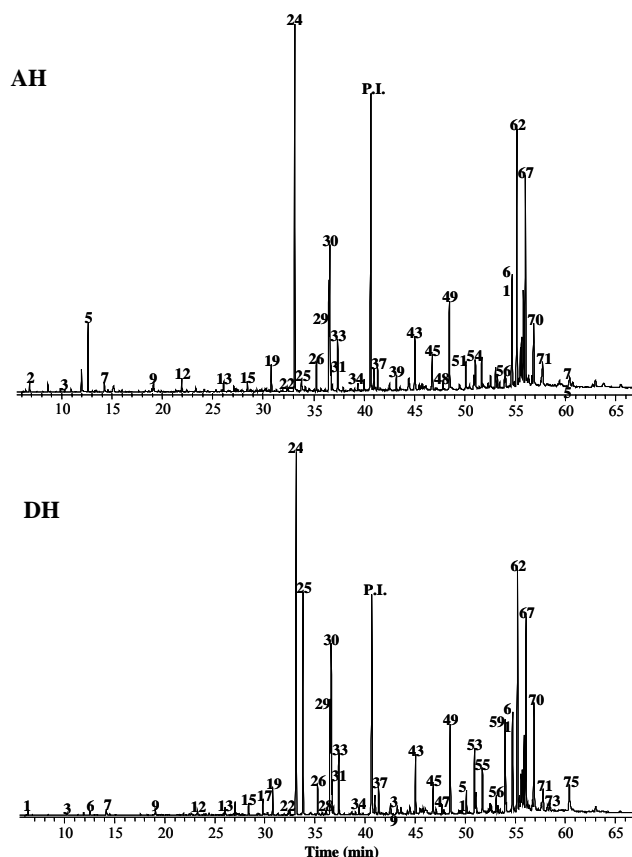


Figura 4.4. Cromatogramas dos extractos em diclorometano derivatizados das bainhas foliares da ‘Dwarf Cavendish’ antes (AH) e depois (DH) da hidrólise alcalina. P.I.: Padrão Interno. (Picos identificados nas Tabelas 4.8 a 4.14).

Na Figura 4.5 estão apresentadas as principais famílias identificadas nos extractos em diclorometano antes e após a hidrólise alcalina.

Os ácidos gordos e os esteróis são as famílias maioritárias dos componentes lipofílicos encontrados nas diferentes partes morfológicas desta espécie de bananeira (Figura 4.5, Tabela 4.8). Além das famílias acima referidas, foram também identificados nestes extractos quantidades inferiores de compostos aromáticos e alcóois alifáticos de cadeia longa, entre outros.

Após a hidrólise alcalina, foi observado um aumento significativo na quantidade total de extractáveis detectados por GC-MS, particularmente de ácidos gordos (Figura 4.5, Tabela 4.8), o que parece sugerir a presença de quantidades significativas de estruturas esterificadas e de alto peso molecular nos extractos originais.

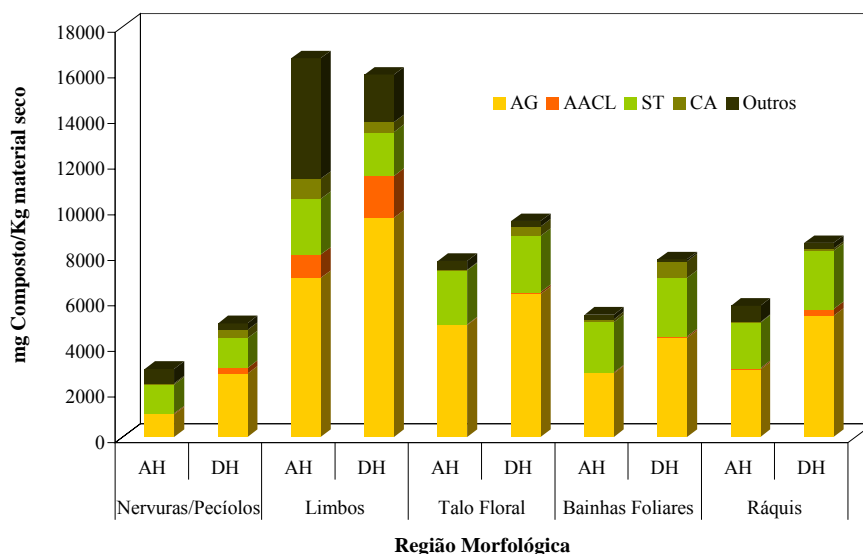


Figura 4.5. Famílias de compostos identificadas nos extractos em diclorometano da ‘Dwarf Cavendish’ antes (AH) e depois (DH) da hidrólise alcalina. **AG:** Ácidos Gordos, **AACL:** Alcóois Alifáticos de Cadeia Longa; **ST:** Esteróis; **CA:** Compostos Aromáticos.

Nas Tabelas 4.8 a 4.14 são apresentadas as famílias e os componentes individuais identificados, assim como as suas abundâncias nos extractos em diclorometano, nas várias regiões morfológicas, antes e após hidrólise alcalina.

Tabela 4.8. Famílias dos componentes lipofílicos identificados nos extractos em diclorometano da ‘Dwarf Cavendish’ e o seu teor antes (AH) e depois (DH) da hidrólise alcalina do extracto (mg de composto/Kg de material seco).

Composto	Nervuras/Pecíolos		Limbos		Talo Floral		Bainhas Foliares		Ráquis	
	AH	DH	AH	DH	AH	DH	AH	DH	AH	DH
Ácidos gordos	991	2775	6970	9623	4909	6268	2793	4345	2955	5309
Saturados	770	1770	5841	8046	2609	3135	1809	2417	2611	4111
Insaturados	157	388	142	113	2096	2316	618	901	113	908
Diácidos	8	65	230	413	7	28	12	52	37	65
α -Hidróxi-	29	67	333	51	49	28	132	108	81	53
ω -Hidróxi-	27	485	424	1000	148	761	222	867	113	172
Aromáticos	51	365	887	435	24	420	128	732	28	92
Ácidos cinâmicos	18	275	617	253	8	409	36	658	<1	40
Outros	33	90	270	182	16	11	92	74	28	52
Alcóois Alifáticos	39	253	1034	1836	29	90	40	60	57	301
<C20	4	16	<1	52	4	19	<1	10	<1	19
>C20	35	237	1034	1784	25	71	40	50	57	282
Esteróis	1269	1306	2436	1921	2372	2462	2205	2570	2003	2552
Outros/Não identificados	627	286	5237	2074	373	231	184	84	688	245
TOTAL	2977	4985	16564	15889	7707	9471	5350	7791	5731	8499

É de referir que, a maioria dos componentes destes extractos foi identificada com base nas suas fragmentações características e tempos de retenção obtidos sob condições experimentais descritas anteriormente [140,141] e, em alguns casos identificados por comparação com padrões de fragmentação descritos na literatura.

4.2.1. ÁCIDOS GORDOS

Antes da hidrólise alcalina, os ácidos gordos saturados, tais como os ácidos hexadecanóico (palmitico) **24**, octadecanóico **33** e tetracosanóico **49** são os componentes mais abundantes desta família em todas as regiões morfológicas, variando de 53% a 88% da quantidade total de ácidos gordos (Tabela 4.9).

Após hidrólise alcalina, os ácidos gordos saturados permanecem como o grupo mais abundante (excepto no ráquis), com aumentos que variam entre os 17% (talo floral) e os 130% (nervuras/peciolos). Tal como antes da hidrólise alcalina, os ácidos hexadecanóico, octadecanóico e tetracosanóico são os compostos maioritários deste grupo (Tabela 4.9).

De entre os ácidos gordos saturados, alguns componentes de cadeia ímpar, nomeadamente os ácidos nonanóico **8**, pentadecanóico **19**, heptadecanóico **26**, nonadecanóico **34**, heneicosanóico **39**, tricosanóico **45**, pentacosanóico **51** e heptacosanóico **57** foram também identificados (Tabela 4.9). Apesar dos ácidos gordos de cadeia ímpar não serem muito usuais nas madeiras [140], a sua presença noutras partes de plantas monocotiledóneas, tais como na palha de arroz, de trigo e de cevada [208-211], sugere que são comuns neste tipo de planta.

Tabela 4.9. Ácidos gordos (mg de composto/Kg de material seco) identificados nos extractos em diclorometano das diferentes partes morfológicas da ‘Dwarf Cavendish’: antes (AH) e depois (DH) da hidrólise alcalina.

Pico	Composto	Nervuras/Pecíolos		Limbos		Talo Floral		Bainhas Foliares		Ráquis	
		AH	DH	AH	DH	AH	DH	AH	DH	AH	DH
ÁCIDOS GORDOS		991	2775	6970	9623	4909	6268	2793	4345	2955	5309
Saturados		770	1770	5841	8046	2609	3135	1809	2417	2611	4111
4	Ácido octanóico	<1	4	43	6	2	3	2	3	7	4
8	Ácido nonanóico	<1	3	<1	n.d.	<1	<1	<1	3	<1	3
12	Ácido dodecanóico	4	17	24	112	8	16	6	11	22	39
15	Ácido tetradecanóico	11	8	220	231	47	63	20	31	64	98
19	Ácido pentadecanóico	22	58	119	146	99	124	54	72	53	146
24	Ácido hexadecanóico	444	810	2356	3612	1578	1775	849	1173	1515	2451
26	Ácido heptadecanóico	24	60	114	211	68	76	60	79	58	88
33	Ácido octadecanóico	55	126	332	508	168	215	105	168	188	188
34	Ácido nonadecanóico	5	15	18	39	11	14	16	21	20	27
37	Ácido eicosanóico	22	57	278	330	74	88	50	70	61	99
39	Ácido heneicosanóico	34	13	120	77	19	18	33	17	31	22
43	Ácido docosanóico	32	160	583	939	139	193	115	161	100	231
45	Ácido tricosanóico	23	57	179	147	57	70	78	85	68	97
49	Ácido tetracosanóico	58	215	507	769	198	282	199	271	175	304
51	Ácido pentacosanóico	14	42	244	83	61	77	62	70	67	88
55	Ácido hexacosanóico	12	83	175	270	63	107	77	131	65	105
57	Ácido heptacosanóico	<1	10	78	26	17	14	34	<1	35	20
71	Ácido triacontanóico	10	32	451	540	<1	<1	49	51	82	101
Insaturados		157	388	142	113	2096	2316	618	901	113	908
22	Ácido 9- <i>trans</i> -hexadecenóico	<1	8	<1	<1	87	10	8	9	<1	<1
23	(<i>cis</i> e <i>trans</i>)	<1	8	n.d.	n.d.	84	101	8	8	24	80
29	Ácido <i>cis</i> -9,12-octadecadienóico	49	122	27	n.d.	1060	1206	245	360	33	306
30	Ácido <i>cis</i> -9,12,15-octadecatrienóico	66	174	28	n.d.	699	844	291	429	17	287
31	Ácido 9-octadecenóico (<i>cis</i>)	35	68	87	113	81	79	53	75	12	159
32	Ácido 9-octadecenóico (<i>trans</i>)	7	8	n.d.	n.d.	85	76	13	20	27	76
Diácidos		8	65	230	413	7	28	12	52	37	65
14	Ácido nonadióico	8	47	230	356	7	28	12	32	37	59
21	Ácido undecanodióico	n.d.	4	<1	57	<1	n.d.	n.d.	<1	<1	6
72	Ácido hexacosanodióico	n.d.	14	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	20	n.d.	<1
α -Hidroxiácidos		29	67	333	51	49	28	132	108	81	53
42	Ácido 2-hidroxi-eicosanóico	13	<1	57	9	18	5	17	8	28	9
48	Ácido 2-hidroxi-docosanóico	<1	13	<1	13	<1	<1	15	12	11	<1
54	Ácido 2-hidroxi-tetracosanóico	16	42	276	29	15	15	72	63	31	29
60	Ácido 2-hidróxi-hexacosanóico	n.d.	12	<1	<1	16	8	28	25	11	15
ω -Hidroxiácidos		27	485	424	1000	148	761	222	867	113	172
41	Ácido 18-hidroxi-octadecanóico	n.d.	3	n.d.	<1	n.d.	9	n.d.	11	n.d.	n.d.
47	Ácido 20-hidroxi-eicosanóico	n.d.	12	n.d.	14	n.d.	26	<1	26	<1	<1
53	Ácido 22-hidroxi-docosanóico	6	132	374	699	23	250	37	209	32	51
59	Ácido 24-hidroxi-tetracosanóico	<1	152	<1	213	18	290	32	263	7	27
63	Ácido 25-hidroxi-pentacosanóico	n.d.	19	<1	<1	n.d.	13	12	37	<1	16
70	Ácido 26-hidroxi-hexacosanóico	21	83	50	74	107	142	88	187	74	78
73	Ácido 27-hidroxi-heptacosanóico	n.d.	14	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	28	n.d.	<1
75	Ácido 28-hidroxi-octacosanóico	n.d.	70	<1	<1	<1	31	53	106	n.d.	<1

n.d. - não detectado

Os ácidos gordos derivatizados sob a forma de ésteres trimetilsililados, são facilmente identificados devido ao seu padrão de fragmentação típico. Além do pico base correspondente ao ião resultante da perda de um grupo metilo $[M-15]^+$ do grupo TMS, os iões a m/z 73 e 75, correspondentes aos fragmentos $[(CH_3)_3Si]^+$ e $[(CH_3)_2SiOH]^+$ respectivamente, são muito comuns nos espectros de massa dos derivados TMS. Outros fragmentos iônicos proeminentes, característicos dos espectros de massa dos ésteres trimetilsililados de ácidos gordos saturados e mono-insaturados, são os iões a m/z 117, 129, 132 e 145 (Figura 4.6) [149,150].

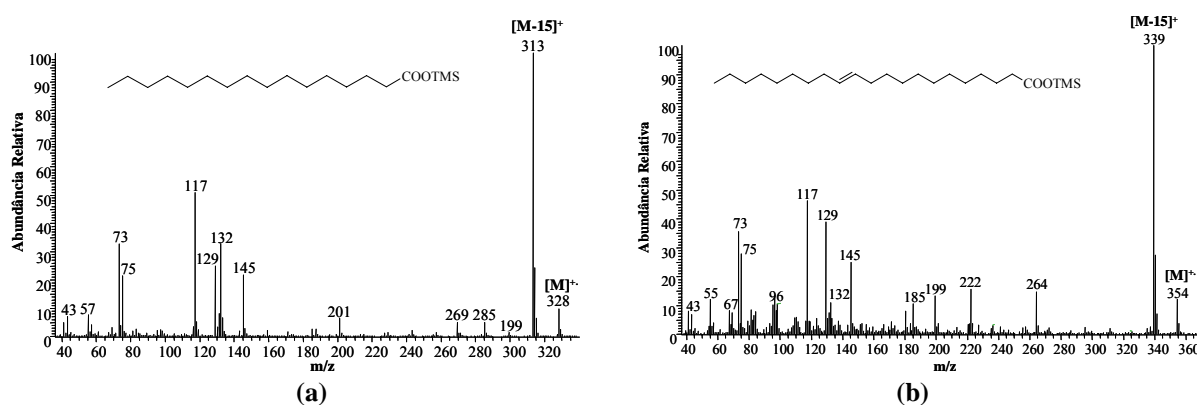


Figura 4.6. Espectros de massa dos derivados TMS dos ácidos hexadecanóico (a) e oleico (b).

Juntamente com os anteriores, foram também identificados alguns ácidos gordos insaturados, representando no caso do talo floral *ca.* 42% do total de ácidos gordos analisados antes da hidrólise alcalina. Os ácidos *cis*-9,12-octadecadienóico (ácido linoleico) **29**, *cis*-9,12,15-octadecatrienóico (ácido linolénico) **30** e 9-octadecenóico (ácido oleico) **31** e **32** são os compostos mais abundantes deste grupo (Tabela 4.9). Após a hidrólise alcalina, foi observado um acréscimo na quantidade de ácidos gordos insaturados (particularmente nos ácidos linoleico e linolénico) em quase todas as partes morfológicas, tendo sido este aumento mais significativo no ráquis (706%) (Tabela 4.9).

Nos extractos em diclorometano foram também identificados vários ácidos gordos α e ω -hidroxilados, representando, antes da hidrólise alcalina, entre 4% a 13% do total dos ácidos gordos, respectivamente.

A identificação dos derivados TMS dos α e ω -hidroxiácidos foi possível através dos seus padrões de fragmentação típicos [140,144,149,150].

Tal como os ésteres TMS dos ácidos gordos saturados, os ω -hidroxiácidos apresentam um pico intenso a $[M-15]^+$ e os iões a m/z 117, 129 (Figuras 4.7 e 4.8) [149,150]. Outros picos típicos presentes nos espectros de massa destes compostos são os correspondentes aos dois iões abundantes a m/z 204 e 217, resultantes do rearranjo dos grupos TMS em compostos de cadeia longa, característicos quer dos ω -hidroxiácidos quer dos diácidos [144,150] e a presença dos iões a m/z 89 e 103, característicos dos alcóois alifáticos (Figura 4.22) [140,149,150].

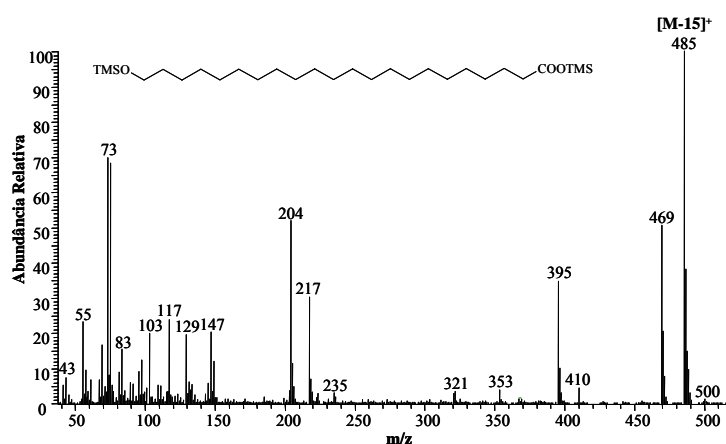


Figura 4.7. Espectro de massa do derivado TMS do ácido 22-hidroxidocosanóico

No caso dos α -hidroxiácidos, para além dos picos característicos dos ésteres alifáticos trimetilsililados (m/z $[M-15]^+$, 117 e 129), os seus espectros de massa distinguem-se pela presença do pico base a m/z $[M-117]^+$, correspondente ao ião resultante da clivagem na posição α [63], que confirma a existência de um grupo hidroxilo na posição α do ácido gordo (Figura 4.8).

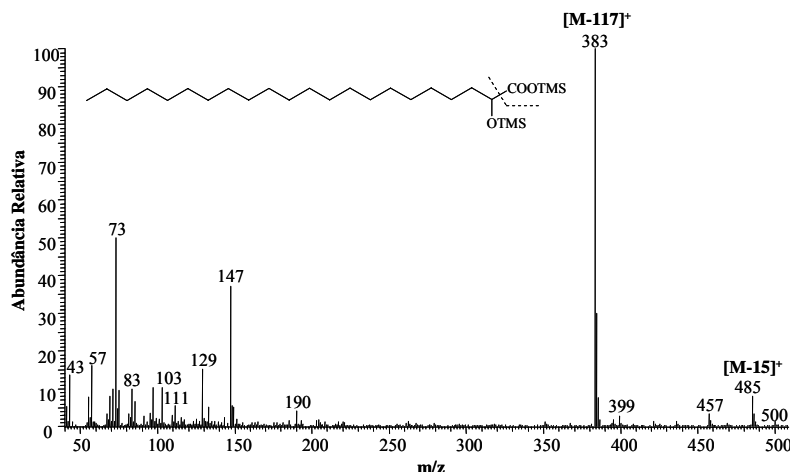


Figura 4.8. Espectro de massa do derivado TMS do ácido 2-hidroxidocosanóico.

Os ω -hidroxiácidos são os hidroxiácidos mais abundantes em quase todas as regiões morfológicas, em particular após a hidrólise alcalina dos extractos (Tabela 4.9). Os ácidos 22-hidroxidocosanóico **53**, 24-hidroxitetracosanóico **59** e 26-hidroxi-hexacosanóico **70** são os componentes maioritários deste grupo. Nesta família de compostos foi registado o maior aumento após hidrólise alcalina (Tabela 4.9), variando entre os 53% no ráquis e os 1700% nas nervuras/pecíolos.

Os α -hidroxiácidos estão presentes em menores quantidades. Os ácidos 2-hidroxi-eicosanóico e 2-hidroxitetracosanóico são os α -hidroxiácidos maioritários encontrados em quase todas as partes morfológicas (Tabela 4.9). Após a hidrólise alcalina, a quantidade destes compostos diminuiu ligeiramente em quase todas as partes morfológicas (excepto nas nervuras/pecíolos), com a maior variação observada nos limbos. Esta diminuição pode ser explicada pela sua tendência para descarboxilar sob condições alcalinas, produzindo os correspondentes ácidos gordos saturados com menos um átomo de carbono [216]. A presença de α -hidroxiácidos foi já referida em algumas outras plantas herbáceas tais como a *Thymus vulgaris* L. [217] e a *Arabidopsis thaliana* [218].

Quantidades menores de alguns diácidos, como o ácido nonadióico (azelaico) (**14**) como componente principal, foram também encontradas em todos os extractos (Tabela 4.9). De igual modo, a quantidade destes ácidos aumentou substancialmente após a hidrólise alcalina, com incrementos variando de 80% nos limbos e no ráquis a 670% nas nervuras/pecíolos.

Através da Figura 4.9, é possível observar que o aumento nos ácidos gordos após hidrólise é devido principalmente aos ácidos com mais de 16 átomos de carbono ($>C16$). Nos limbos e no ráquis, o aumento na quantidade total de ácidos gordos, após hidrólise alcalina, é devido maioritariamente aos ácidos com cadeia compreendida entre 16 e 20 átomos de carbono ($16 < C < 20$), enquanto que no talo floral e nas bainhas foliares os ácidos gordos com uma cadeia superior a C20 apresentam uma maior contribuição.

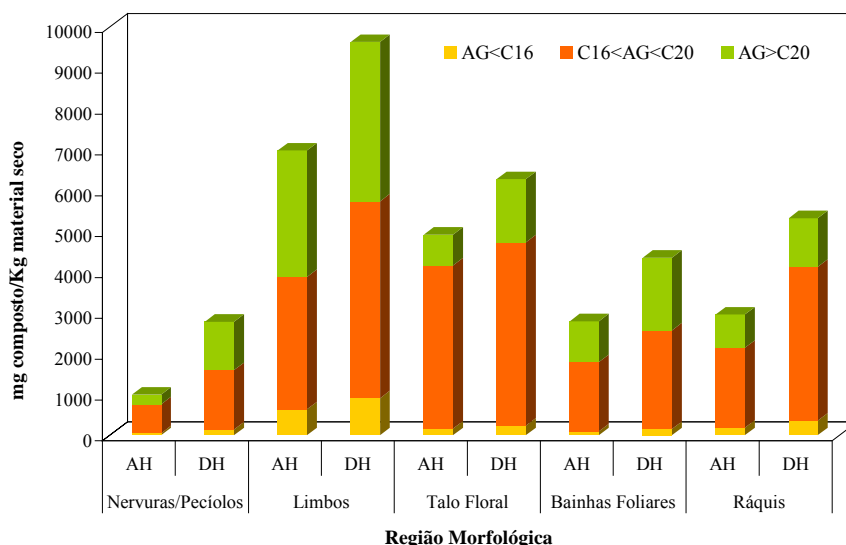


Figura 4.9. Ácidos gordos identificados no extracto em diclorometano da ‘Dwarf Cavendish’ antes (AH) e depois (DH) da hidrólise alcalina. Ácidos gordos com uma cadeia carbonada menor que 16 carbonos ($AG < 16$), entre 16 e 18 carbonos ($C16 < AG < C20$) e superior que 20 carbonos ($AG > C20$).

O aumento acentuado observado na quantidade dos ácidos gordos após a hidrólise alcalina, indica que uma fracção importante destes compostos está presente na planta sob a forma esterificada.

De forma a verificar a presença de ésteres de ácidos gordos na bananeira, os extractos em diclorometano (antes da hidrólise) foram analisados por GC-MS com uma coluna de 15 m, usando condições cromatográficas que permitem a eluição e detecção destes compostos lipofílicos menos voláteis (Figura 4.10) [140,141].

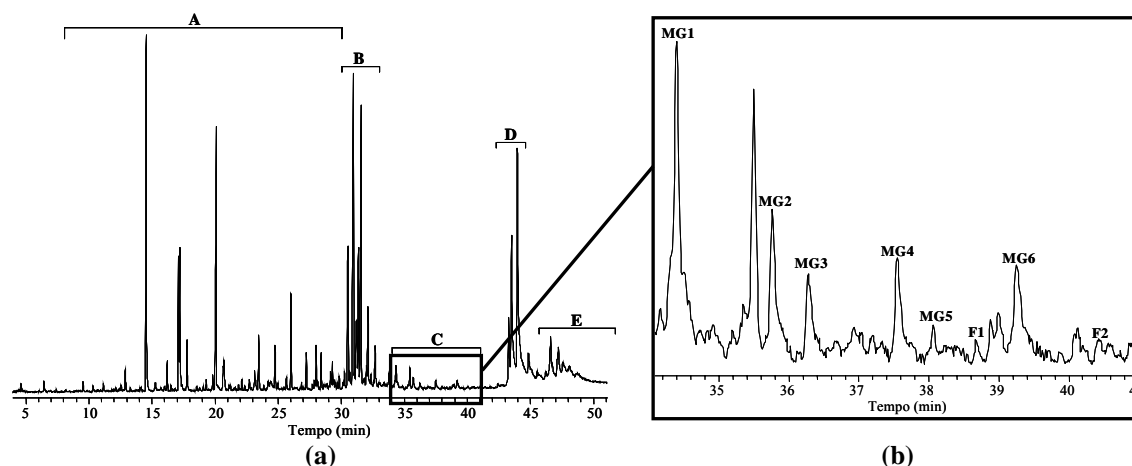


Figura 4.10. Cromatograma do extracto em diclorometano das bainhas foliares antes da hidrólise alcalina obtido com a coluna curta (15 m). (a) A: Ácidos gordos/Álcoois alifáticos; B: Esteróis; C: Monoglicéridos e Ferulatos; D: Glucosídeos de esterilo e E: Ésteres de esterilo. (b) Ampliação da Região C do cromatograma **MG1**: 1-(hexacosanoil)glicerol, **MG2**: 1-(24-hidroxitetracosanoil)glicerol; **MG3**: 1-(octacosanoil)glicerol; **MG4**: 1-(26-hidroxi-hexacosanoil)glicerol; **MG5**: 1-(triacontanoil)glicerol; **MG6**: 1-(28-hidroxi-octacosanoil)glicerol; **F1**: ferulato de docosanoílo e **F2**: ferulato de tetracosanoílo.

Foram identificados seis monoglicéridos nos extractos das várias partes morfológicas, nomeadamente: o 1-(hexacosanoil)glicerol **MG1**, o 1-(octacosanoil)glicerol **MG2**, o 1-(triacontanoil)glicerol **MG3**, o 1-(24-hidroxitetracosanoil)glicerol **MG4**, o 1-(26-hidroxi-hexacosanoil)glicerol **MG5** e o 1-(28-hidroxi-octacosanoil) glicerol **MG6**. A identificação destes monoglicéridos foi feita com base nos seus tempos de retenção relativos e nos padrões de fragmentação dos seus derivados sililados. Estes compostos apresentam picos característicos a m/z $[M-15]^+$, $[M-103 (CH_2OTMS)]^+$, $[M-205 (C_2H_3(OTMS)_2)]^+$, $[M-219 (C_3H_5(OTMS)_2)]^+$, 219, 205, 103 e fragmentos comuns dos ésteres alifáticos sililados (m/z 147, 129, 117) (Figura 4.11) [152].

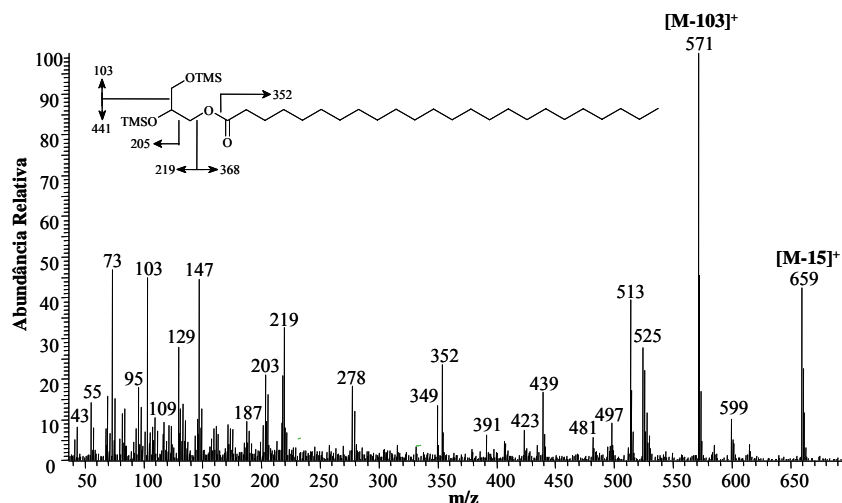


Figura 4.11. Espectro de massa do derivado TMS do 1-(24-tetracosanoil)glicerol.

Paralelamente aos monoglicérides, foram detectadas quantidades vestigiais de dois ferulatos: o ferulato de docosanoílo **F1** e o ferulato de tetracosanoílo **F2**, tendo sido a sua identificação feita a partir dos padrões de fragmentação dos seus derivados sililados (Figura 4.12) [152]. Os seus espectros de massa são caracterizados por possuírem picos de íon molecular intensos e pela presença de um íon proeminente a m/z 249, correspondente ao fragmento feruloílo, resultante da clivagem da ligação éster (Figura 4.12). Outros fragmentos também presentes são provenientes da cadeia alifática (m/z 55, 43) e, no caso dos ésteres de ω -hidroxiácidos os íons típicos dos ésteres alifáticos (m/z 117 e 129) [140,152].

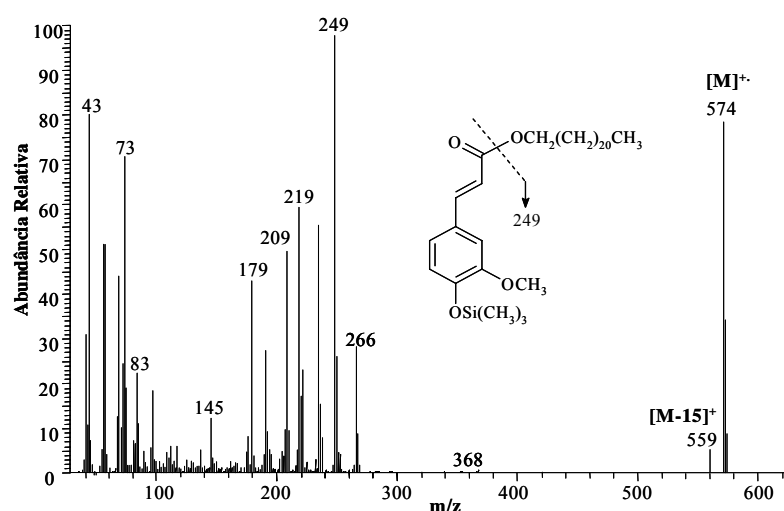


Figura 4.12. Espectro de massa do derivado TMS do ferulato de docosanoílo.

Foram também identificados em todas as partes morfológicas, com base nas suas fragmentações características e tempos de retenção, alguns ésteres de esterilo tais como o octadecanoato de cicloartenilo (ou octadecanoato de cicloeucalenilo) e o octadecanoato de 24-metilenocicloartenilo. As fragmentações mais importantes nos espectros de massa dos ésteres de esterilo são os iões correspondentes à clivagem da ligação *O*-alquila (3-C-O do esterol) com formação do ião $[RCO_2H+H]^+$ e do ião com retenção de carga no esterol, que no caso do octadecanoato de 24-metilenocicloartenilo correspondem aos picos a m/z 285 e 422, respectivamente (Figura 4.13) [153].

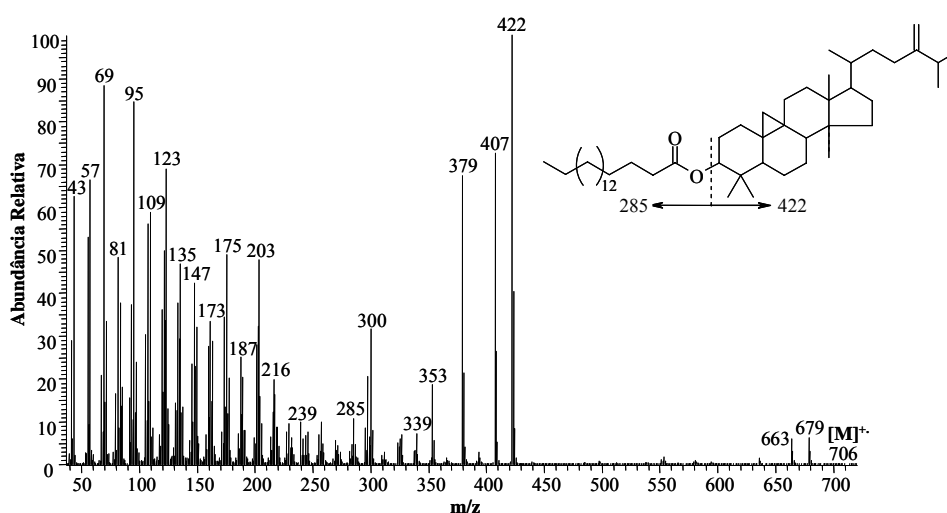


Figura 4.13. Espectro de massa do octadecanoato de 24-metilenocicloartenilo.

No entanto, as quantidades detectadas de glicéridos, ferulatos e ésteres de esterilo de ácidos gordos, não explicam o aumento observado na quantidade de ácidos gordos após a hidrólise alcalina, o que significa que os ácidos gordos estão esterificados com outras estruturas. Por outro lado, este aumento não pode ser explicado também pela presença de ceras, visto que estas estruturas não foram detectadas por GC-MS com a coluna de 15 m, o que está de acordo com o pequeno aumento observado no teor de álcoois alifáticos após hidrólise alcalina (secção 4.2.3). A explicação mais plausível, é a presença de ácidos gordos esterificados com estruturas não voláteis de elevado peso molecular do tipo suberina e/ou cutina, não detectáveis por GC-MS [83,84]. Esta afirmação é corroborada com o observado nos espectros de FTIR-ATR e RMN de ^{13}C de estado sólido do material antes e após extração (Figuras 4.1 e 4.2).

Apesar da presença dos ácidos palmítico **24** e oleico **31** e **32**, particularmente em formas esterificadas, ter sido referida em outras espécies de *Musa* [58,59,66,67], a identificação e a quantificação detalhada dos ácidos gordos livres e esterificados presentes nas diferentes regiões morfológicas da bananeira foi feita pela primeira vez no presente trabalho.

4.2.2. ESTERÓIS

Os esteróis representam cerca de 17 a 42% dos componentes lipofílicos identificados, sendo o β -Sitosterol, seguido pelo campesterol e estigmasterol, os esteróis maioritários presentes em todas as regiões morfológicas (Tabela 4.10).

Tabela 4.10. Esteróis (mg de composto/Kg de material seco) identificados nos extractos em diclorometano das diferentes partes morfológicas da ‘Dwarf Cavendish’, antes (AH) e depois (DH) da hidrólise alcalina.

PicoComposto	Nervuras/Pecíolos		Limbos		Talo Floral		Bainhas Foliares		Ráquis	
	AH	DH	AH	DH	AH	DH	AH	DH	AH	DH
Esteróis	1269	1306	2436	1921	2372	2462	2205	2570	2003	2552
56 Colesterol + α -Tocoferol ^a	48	45	263	112	69	64	53	51	54	39
61 Campesterol + Ácido octacosanóico	186	222	609	574	342	327	338	393	312	427
62 Estigmasterol	357	323	417	343	939	1020	712	869	696	975
64 24-Metilenopolinastanol	36	37	167	76	n.d.	86	88	95	54	76
65 31-Norciclolaudenona	13	17	n.d.	n.d.	74	41	117	99	168	154
66 Cicloeucalenona	66	66	n.d.	n.d.	100	79	217	203	325	340
67 β -Sitosterol	532	481	930	742	639	613	520	605	281	423
69 Cicloeucalenol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	15	16	23	17	39	40
70 Cicloartenol	21	83	50	74	107	142	88	187	74	78
71 24-Metilenocicloartanol	10	32	n.d.	n.d.	87	74	49	51	<1	<1

n.d.- não detectado

As estruturas dos esteróis identificados na ‘Dwarf Cavendish’ estão representadas na Figura 4.14.

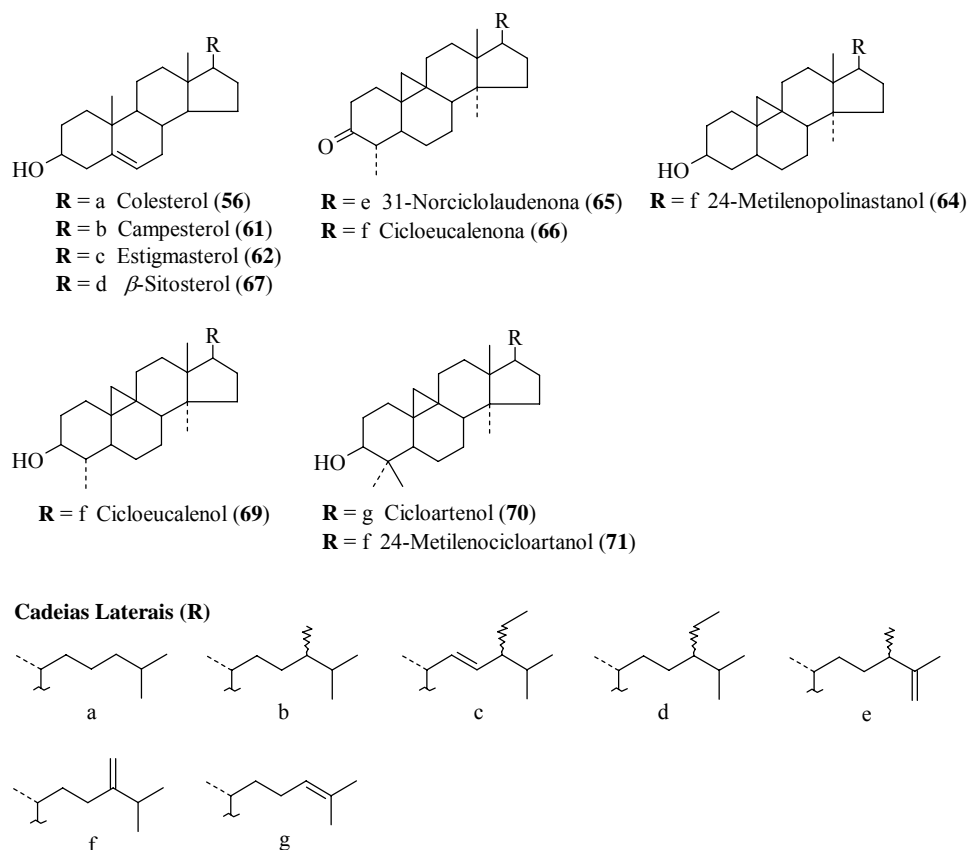


Figura 4.14. Estruturas dos esteróis identificados na bananeira ‘Dwarf Cavendish’.

O padrão de fragmentação dos esteróis varia consoante a presença, número e posição de ligações duplas, assim como com a natureza dos vários grupos substituintes [147,149].

Em geral, os éteres trimetilsililados dos esteróis apresentam iões moleculares $[M]^+$ intensos, acompanhados de iões proeminentes a m/z $[M-15]^+$ e $[M-90]^+$, resultantes da perda de um grupo metilo e da eliminação 1,2 do grupo trimetilsilanol (TMSOH), respectivamente (Figura 4.15) [147,149]. Outros iões importantes, característicos dos 3-hidróxi- Δ^5 -esteróis, são os observados a m/z 129 e $[M-129]^+$, que correspondem à perda conjunta do grupo TMS com os carbonos C1, C2 e C3 do anel A, com retenção de carga em ambos os fragmentos e, o ião a m/z 213, resultante da perda da cadeia lateral com os carbonos C15, C16 e C17 do anel D (Figura 4.15) [147,149,219].

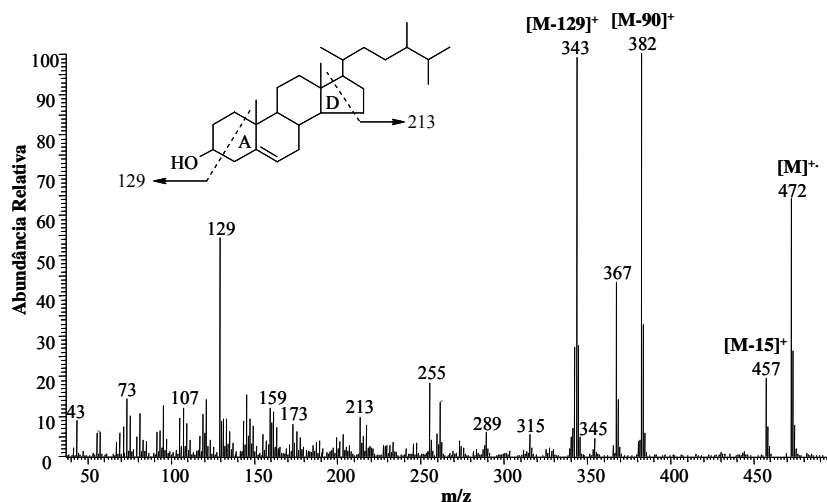


Figura 4.15. Espectro de massa do derivado TMS do campesterol.

No caso do pico 25 (Figura 4.4), correspondente ao 24-metilenopolinastanol, a sua identificação foi feita com base na detecção dos fragmentos do seu derivado sililado (Figura 4.16) a m/z 484 $[M]^+$, 469 $[M-CH_3]^+$, 441 $[M-C_3H_7]^+$, 394 $[M-TMSOH]^+$, 379 $[M-CH_3-TMSOH]^+$ e 351 $[441-TMSOH]^+$. Esta identificação foi confirmada pela análise por GC-MS do extracto acetilado, baseado na detecção dos fragmentos característicos do acetato de 24-metilenopolinastanol: m/z 454 $[M]^+$, 439 $[M-CH_3]^+$, 411 $[M-C_3H_7]^+$, 394 $[M-HOAc]^+$, 379 $[M-CH_3-HOAc]^+$, 351 $[411-HOAc]^+$, 329 $[M-cadeia lateral (C_9H_{17})]^+$ [62].

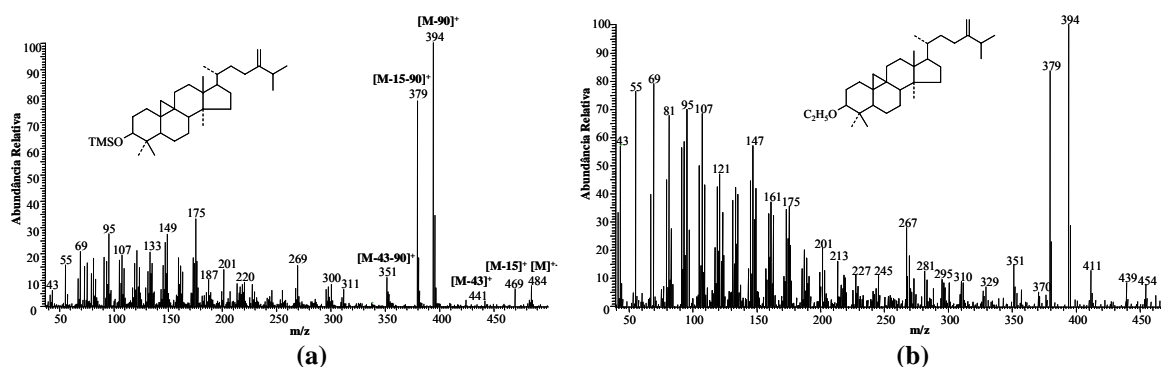


Figura 4.16. Espectros de massa dos derivados: (a) Trimetilsililado e (b) Acetilado do 24-metilenopolinastanol.

Em relação aos espectros de massa dos picos **65** e **66** (Figura 4.17), os quais apresentam um padrão de fragmentação muito semelhante, característico dos derivados triterpénicos, a ausência do fragmento a m/z 73, característico do substituinte TMS, dá-nos

a indicação que estes compostos não possuem algum grupo hidroxilo livre, pelo que ao ião molecular a m/z 424 pode ser atribuída uma fórmula molecular de $C_{30}H_{48}O$, correspondente a uma cetona triterpénica.

De facto, o espectro de massa, com fragmentos a m/z 424, 409 $[M-CH_3]^+$, 381 $[M-C_3H_7]^+$, 367, 355 $[M-C_5H_{10}]^+$, 341 $[M-C_6H_{11}]^+$ 327 $[M-C_7H_{13}]^+$ e 299 $[M-C_9H_{17}]^+$, é característico de duas cetonas triterpénicas previamente identificadas na casca da banana e nas flores de algumas espécies de *Musa*: a 31-norciclolaudenona **65** e a cicloeucalenona **66** (Figura 4.17) [59,62,64].

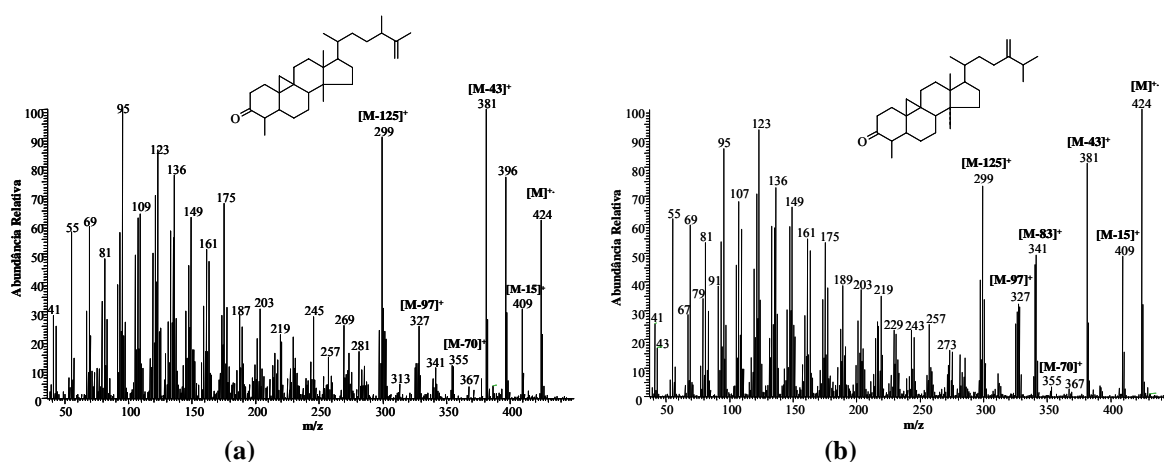


Figura 4.17. Espectros de massa da 31-norciclolaudenona (a) e da cicloeucalenona (b).

A identificação destas duas cetonas isoméricas baseou-se na diferença entre os seus tempos de eluição e na maior intensidade do fragmento a m/z 341 observado na cicloeucalenona, devido à insaturação existente em C-24 (Figura 4.17) [63].

A presença destes dois 3-oxo-4 α -metilesteróis nas diferentes partes morfológicas da bananeira ‘Dwarf Cavendish’ é referida aqui pela primeira vez, visto que, em trabalhos anteriores, estes compostos foram apenas identificados na casca da banana e nas flores da bananeira [59,62,64].

Tal como os compostos anteriores, o cicloeucalenol **69** e o cicloartenol **70** foram identificados com base no seu tempo de eluição. A título de exemplo, na Figura 4.18 é apresentado o espectro do cicloeucalenol. Tratando-se de dois isómeros posicionais, os seus espectros de massa são muito idênticos [59,151], apresentando por conseguinte os

mesmos iões proeminentes a m/z 496 $[M]^+$, 483, $[M-CH_3]^+$, 408 $[M-TMSOH]^+$, 393 $[M-TMSOH-CH_3]^+$, 365, 353, 300 e 283.

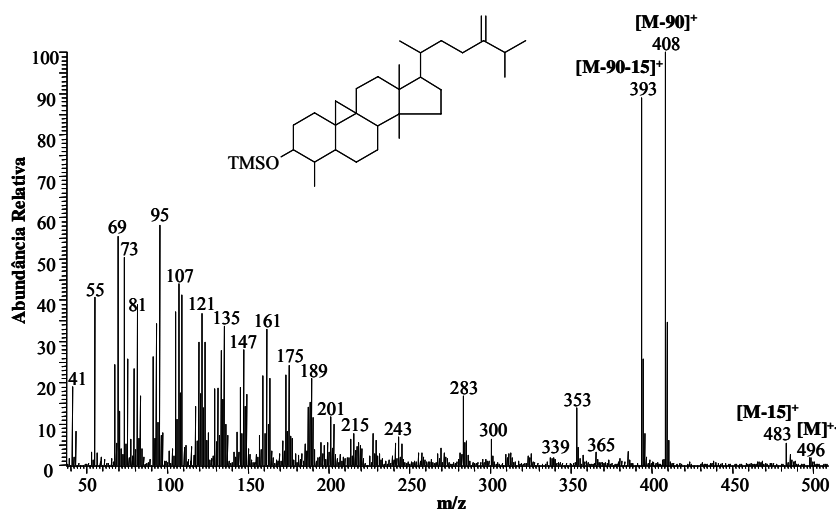


Figura 4.18. Espectro de massa do derivado TMS do cicloeculenol.

Os picos **56** e **71** foram atribuídos ao colesterol e ao 24-metilenocicloartanol, respectivamente, com base nas fragmentações características dos seus derivados TMS [148,151], tendo sido a identificação do primeiro, confirmada ainda por injeção de uma amostra de referência. Embora o colesterol seja mais abundante no reino animal, a sua presença em quantidades vestigiais nas plantas é usual [50,220].

Após a hidrólise alcalina, a proporção relativa dos diferentes esteróis não se altera significativamente, o que leva a crer que as proporções dos esteróis livres e esterificados são muito semelhantes na bananeira. Contudo, no ráquis, o aumento nos teores de estigmasterol e β -sitosterol foi mais acentuado.

O pequeno aumento observado nas quantidades dos esteróis após a hidrólise alcalina, está de acordo com as quantidades moderadas de ésteres de esterilo detectados na análise por GC-MS com a coluna de 15 m, como já foi mencionado. Para além da identificação de ésteres de esterilo foi ainda possível a detecção de três glucosídeos de esterilo (Figura 4.19): o 3- β -D-glucopiranosídeo de campesterilo **1**, estigmasterilo **2** e β -sitosterilo **3** (Figura 4.20), presentes em grandes quantidades em todas as fracções.

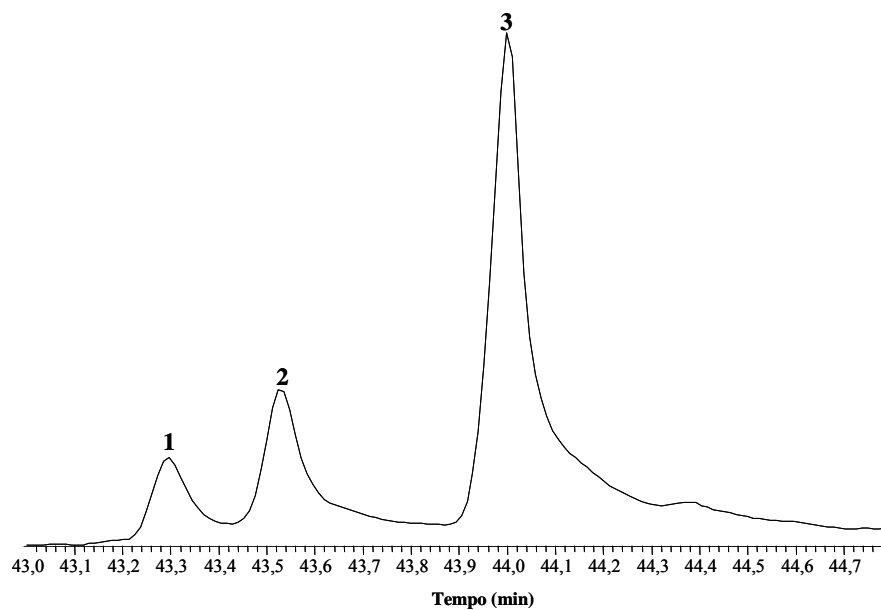


Figura 4.19. Expansão do cromatograma do extracto em diclorometano das bainhas foliares antes da hidrólise alcalina obtido com a coluna curta (15 m) correspondente à região D da Figura 4.10, atribuída aos glucosídeos de esterilo: 3- β -D-glucopiranosídeo de campesterilo **1**, estigmasterilo **2** e β -sitosterilo **3**.

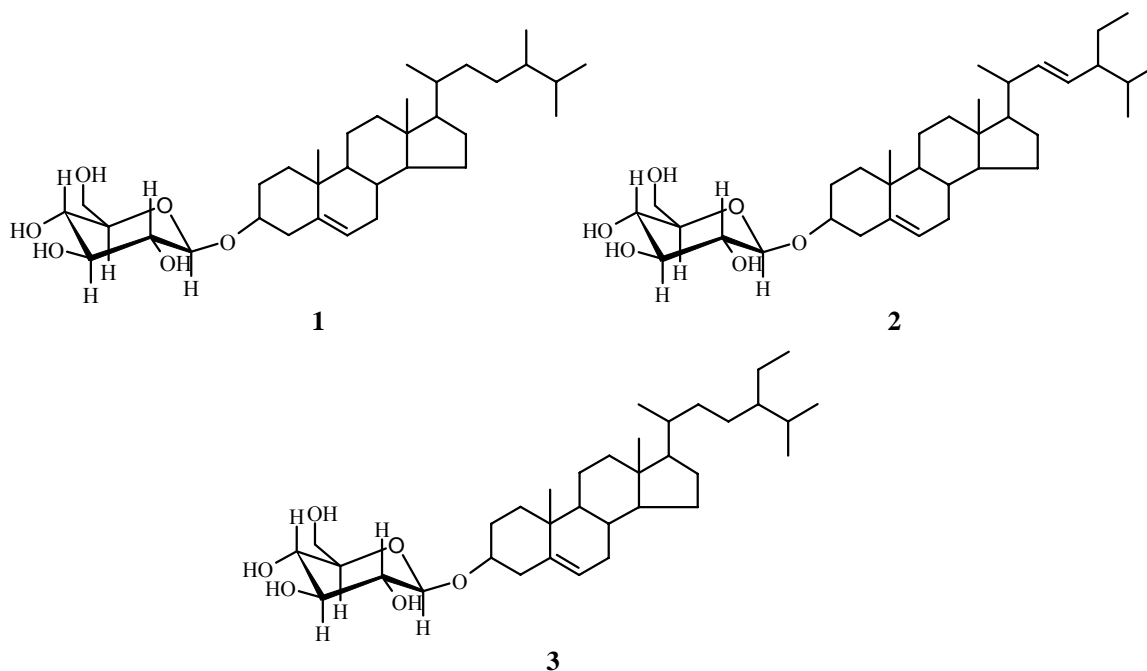


Figura 4.20. Estrutura do 3- β -D-glucopiranosídeo de campesterilo (**1**), estigmasterilo (**2**) e β -sitosterilo (**3**).

O glucosídeo de β -sitosterilo é o componente mais abundante, seguido dos glucosídeos de estigmasterilo e campesterilo (Tabela 4.11).

Tabela 4.11. Glucosídeos de esterilo identificados nas várias partes morfológicas da ‘Dwarf Cavendish’ (mg de composto/Kg de material seco).

Composto	Nervuras/Pecíolos	Limbos	Talo Floral	Bainhas Foliares	Ráquis
1 3- β -D-Glucopiranosídeo de campesterilo	139	101	119	224	106
2 3- β -D -Glucopiranosídeo de estigmasterilo	352	209	263	624	291
3 3- β -D -Glucopiranosídeo de β -sitosterilo	1050	1350	679	976	441
Total	1541,5	1541	1660	1061	1824

A sua identificação como derivados trimetilsililados baseou-se no seu espectro de massa característico e por comparação com os dados encontrados na literatura [145,154].

Na Figura 4.21 apresenta-se, a título de exemplo, o espectro de massa do glucosídeo de β -sitosterilo.

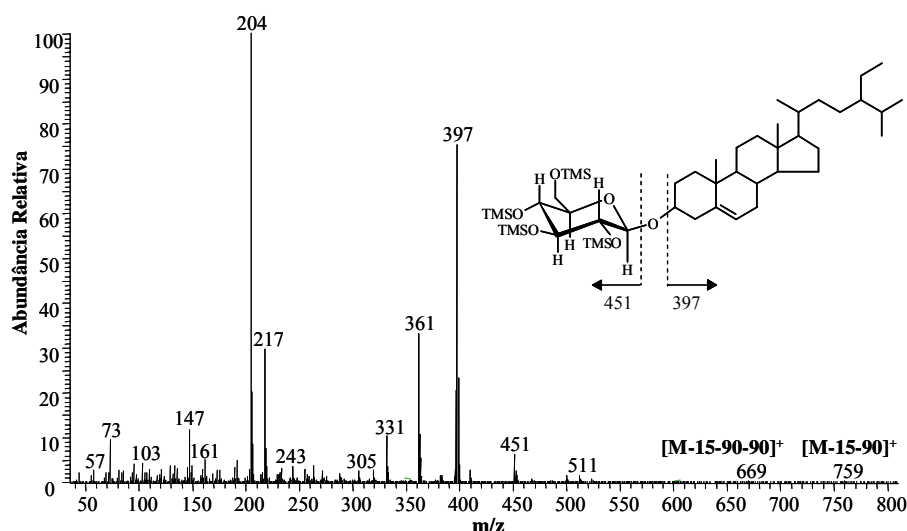


Figura 4.21. Espectro de massa do derivado TMS do glucosídeo de β -sitosterilo.

No espectro de massa dos derivados sililados dos glucosídeos de esterilo (Figura 4.21), o pico do ião molecular não aparece, pelo que o seu peso molecular é determinado indirectamente com base na massa dos iões $[M-15-90]^+$ e $[M-15-90-90]^+$. A perda do fragmento de açúcar (tetra-TMS) com retenção de carga na porção do açúcar e clivagem da

ligação glicosídica C-O, produz um ião m/z de 451, que por sua vez perde um fragmento trimetilsilanol [TMSOH] produzindo um pico mais intenso a m/z 361. A elevada intensidade relativa do ião a m/z 204 (pico base) e a baixa abundância do pico a m/z 217, é uma indicação da configuração de uma hexose piranosídica. Por fim, a clivagem da ligação 3-C-O com retenção de carga no fragmento de esterol, produz os iões intensos a m/z 383, 395 e 397, correspondentes aos glucosídeos de esterilo **1** a **3**, respectivamente.

Apesar destes compostos serem comuns no reino vegetal [221], na maioria das espécies encontram-se presentes em pequenas quantidades. No caso das musáceas, Ghoshal e Saini [66] detectaram na *Musa paradisiaca* L. quantidades vestigiais destes compostos.

Os glucosídeos de esterilo têm sido intensivamente estudados nas últimas décadas devido aos seus amplos benefícios para a saúde (particularmente na sua capacidade de diminuir o teor de colesterol no sangue) [222,223]. Recentemente, este tipo de compostos, nomeadamente o glucosídeo de β -sitosterilo tem sido alvo de uma maior atenção devido às suas propriedades específicas. Um grande número de actividades farmacológicas, tais como: hepatoprotectiva [224], anti-inflamatória [225,226] entre outras, têm sido atribuídas ao glucosídeo de β -sitosterilo, sendo contudo as suas actividades anti-ulcerogénicas e anti-cancerígenas as mais relevantes [227,228].

Apesar desta família de compostos ter sido exaustivamente estudada noutras espécies de *Musa* [58-67,213], a identificação e quantificação dos esteróis da ‘Dwarf Cavendish’ é referida neste trabalho pela primeira vez. É de salientar que dada a sua elevada abundância nos extractos em estudo, os esteróis constituem a segunda família mais abundante dos extractáveis lipofílicos da ‘Dwarf Cavendish’.

4.2.3. ÁLCOOIS ALIFÁTICOS

Os álcoois alifáticos de cadeia longa representam uma pequena fracção do teor total de extractáveis lipofílicos analisados por GC-MS, excepto nos limbos, onde foram detectados elevados teores destes compostos (Tabela 4.8). Os álcoois gordos mais abundantes na ‘Dwarf Cavendish’ são os de cadeia carbonada com mais de 20 átomos de

carbonos, tais como o 1-octacosanol e o 1-triacontanol, seguidos do 1-docosanol e do 1-tetracosanol (Tabela 4.12).

Tabela 4.12. Álcoois Alifáticos de Cadeia Longa (AACL) (mg de composto/Kg de material seco) identificados nos extractos em diclorometano das diferentes partes morfológicas da ‘Dwarf Cavendish’, antes (AH) e depois (DH) da hidrólise alcalina.

Pico Composto	Nervuras/Pecíolos		Limbos		Talo Floral		Bainhas Foliares		Ráquis	
	AH	DH	AH	DH	AH	DH	AH	DH	AH	DH
Álcoois Alifáticos	39	253	1034	1836	29	90	40	60	57	301
20 1-Hexadecanol	<1	6	<1	34	4	10	<1	4	<1	10
27 1-Octadecanol	4	10	<1	18	<1	9	<1	6	<1	9
35 1-Eicosanol	<1	6	<1	19	<1	6	<1	<1	<1	<1
40 1-Docosanol	<1	11	25	47	<1	31	6	15	<1	20
46 1-Tetracosanol	<1	17	n.d.	45	3	12	4	12	<1	37
52 1-Hexacosanol	<1	24	130	122	n.d.	4	<1	5	16	98
58 1-Octacosanol	12	54	250	343	15	10	15	10	16	86
68 1-Triacontanol	23	112	538	1019	7	8	15	8	25	41
74 1-Ditriacontanol	n.d.	13	91	189	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<1

n.d. - não detectado

A identificação dos derivados trimetilsililados dos álcoois alifáticos teve como base o seu padrão de fragmentação típico. Estes apresentam, em geral, iões intensos a m/z $[M-15]^+$ e 75, assim como iões a m/z 89 e 103 $[(CH_3)_3SiOCH_2]^+$, que permitem distingui-los dos derivados TMS dos ácidos gordos (Figura 4.22) [143].

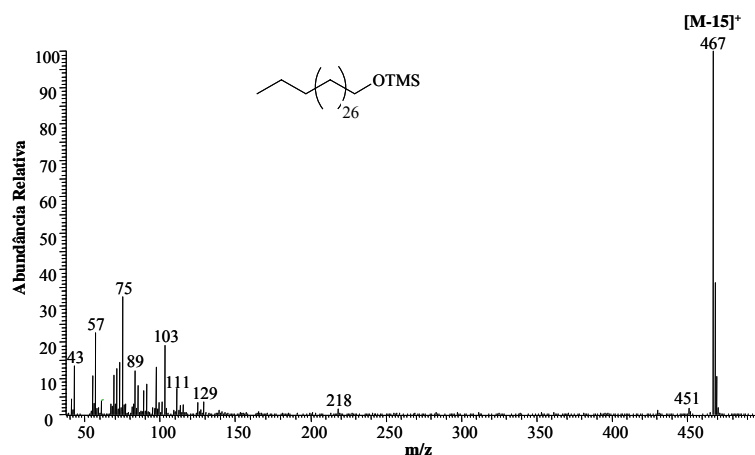


Figura 4.22. Espectro de massa do derivado sililado do 1-triacontanol.

Após a hidrólise alcalina, a quantidade destes compostos aumentou ligeiramente, excepto nos limbos, onde o aumento foi mais significativo. Tal como referido anteriormente, este aumento moderado, confirma que o elevado aumento no teor de ácidos carboxílicos observado após hidrólise não pode ser atribuído à sua presença na forma de ceras.

A presença de álcoois alifáticos de cadeia longa na ‘Dwarf Cavendish’ é referida aqui pela primeira vez.

COMPOSTOS AROMÁTICOS E OUTROS

De modo idêntico ao observado noutras plantas monocotiledóneas [208-211], os extractos em diclorometano da bananeira revelaram a presença de diversos compostos aromáticos (Tabela 4.13).

Tabela 4.13. Compostos aromáticos (mg de composto/Kg de material seco) identificados nos extractos em diclorometano das diferentes partes morfológicas da ‘Dwarf Cavendish’, antes (AH) e depois (DH) da hidrólise alcalina.

Pico	Composto	Nervuras/Pecíolos		Limbos		Talo Floral		Bainhas Foliaves		Ráquis	
		AH	DH	AH	DH	AH	DH	AH	DH	AH	DH
	Compostos Aromáticos	51	365	887	435	24	420	128	732	28	92
3	Ácido benzóico	<1	2	26	20	<1	n.d.	5	5	10	9
7	<i>p</i> -Hidróxibenzaldeído	n.d.	3	n.d.	n.d.	2	<1	23	25	<1	15
9	Vanilina	<1	30	103	13	12	8	20	18	11	14
11	Ácido <i>p</i> -hidróxibenzóico	4	2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	26	5	<1	n.d.
13	Ácido vanílico	22	36	141	97	2	3	18	18	7	9
16	Ácido siringico	7	17	<1	52	n.d.	<1	<1	3	<1	5
17	Ácido <i>cis</i> -ferúlico	n.d.	17	185	31	n.d.	58	n.d.	41	n.d.	5
18	Ácido <i>p</i> -cumárico	6	14	334	88	n.d.	n.d.	<1	5	n.d.	<1
25	Ácido <i>trans</i> -ferúlico	12	244	98	134	8	351	36	612	<1	35

n.d. - não detectado

A identificação destes compostos como derivados TMS foi feita com base em dados existentes na literatura [146,148]. Os picos característicos desta família de compostos são os referentes aos iões moleculares e aos fragmentos devidos a $[M-15]^+$ e $[M-30]^+$.

Antes da hidrólise alcalina, os limbos apresentam o teor mais elevado destes compostos aromáticos, enquanto que no talo floral e no ráquis, estes compostos estão presentes em menor quantidade. Nos limbos, o ácido *p*-cumárico, seguido do ácido ferúlico, representam 75% da fracção aromática. Quantidades menores de ácidos *p*-

hidroxibenzóico, vanílico e siríngico foram também detectados nas várias regiões da bananeira (Tabela 4.13).

Após hidrólise alcalina, o aumento na quantidade de compostos aromáticos (228 a 1650%) é devido maioritariamente ao ácido ferúlico. Este composto está presente em quantidades consideráveis nas bainhas foliares e no talo floral, enquanto que no ráquis é identificado em menor quantidade (Tabela 4.13). À parte da ocorrência de ácido ferúlico esterificado com a lenhina e polissacarídeos em plantas herbáceas [229], o ácido ferúlico pode ser encontrado em várias madeiras esterificado com outros tipos de compostos tais como os álcoois alifáticos [230-233] e com ω -hidroxiácidos [83,84,230]. A análise do extracto com a coluna de 15m permitiu a detecção em quantidades vestigiais de dois ferulatos, nomeadamente o docosanil e o tetracosanil ferulato, nas nervuras/peciolos, talo floral e bainhas foliares (Figura 4.10). Desta forma, a quantidade de ácido ferúlico detectada após a hidrólise alcalina não pode ser explicada com base nos teores destes derivados; o que implica que o ácido ferúlico deverá estar esterificado com outros compostos. Uma vez mais, uma explicação possível para a origem do ácido ferúlico na bananeira é a sua esterificação com estruturas de elevado peso molecular do tipo cutina e/ou suberina [83,84], não voláteis e não detectáveis na análise por GC-MS dos extractos AH.

O α -tocoferol é outro composto presente na bananeira em pequenas quantidades. Este composto foi identificado com base nas fragmentações características do derivado sililado [155] e no tempo de retenção (Figura 4.23). Este componente pertence a um grupo de vitaminas lipofílicas solúveis, os tocoferóis (vitamina E), que se encontram largamente distribuídos em plantas e particularmente em sementes de cereais tais como trigo, cevada e centeio. O α -tocoferol é conhecido por ter propriedades antioxidantes [155].

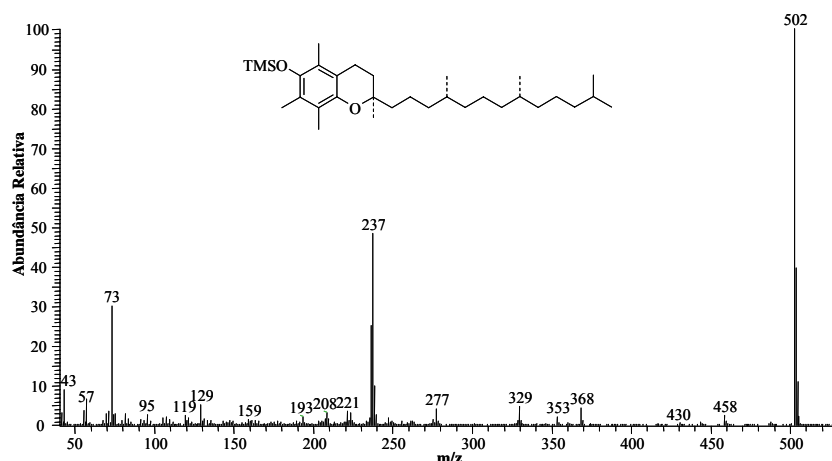


Figura 4.23. Espectro de massa do derivado TMS do α -tocoferol.

De entre os outros compostos identificados nos extractos em diclorometano (antes da hidrólise alcalina) destacam-se o glicerol, os derivados isoprénicos e os alcanos (Tabela 4.14).

Tabela 4.14. Outros componentes (mg de composto/Kg de material seco) presentes nos extractos em diclorometano das diferentes partes morfológicas da ‘Dwarf Cavendish’, antes (AH) e depois (DH) da hidrólise alcalina.

Pico	Composto	Nervuras/Pecíolos		Limbos		Talo Floral		Bainhas Foliaves		Ráquis	
		AH	DH	AH	DH	AH	DH	AH	DH	AH	DH
		612	245	4506	2033	240	83	137	33	598	110
1	Octanol + Ácido 2-hexenóico	n.d.	40	n.d.	108	n.d.	35	n.d.	10	n.d.	10
2	Ácido oxálico	<1	7	118	15	23	5	16	n.d.	53	4
5	Glicerol	518	9	3290	78	189	8	121	10	517	21
6	Ácido butanodióico	<1	6	115	30	1	<1	<1	<1	n.d.	3
10	Eritrose	10	n.d.	20	n.d.	13	n.d.	n.d.	n.d.	14	n.d.
28	Fitol	4	40	402	981	14	35	<1	13	<1	57
38	Pentacosano	7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
44	Heptacosano	27	39	87	103	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	14	15
50	Nonacosano	46	104	474	718	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<1	n.d.

n.d. - não detectado

Os alcanos encontram-se em maior abundância nas nervuras/pecíolos, nos limbos e em menores quantidades no ráquis. O heptacosano e o nonacosano foram os alcanos identificados em maior quantidade. Estes compostos não foram identificados no talo floral e nas bainhas foliares.

4.2.4. CONCLUSÃO

O presente trabalho constitui um dos primeiros estudos mais exaustivos sobre a composição dos extractáveis lipofílicos de diferentes partes morfológicas da bananeira ‘Dwarf Cavendish’.

As várias partes da planta em estudo, em particular os limbos, mostraram possuir uma elevada percentagem de extractáveis lipofílicos (1-5%), sendo as famílias maioritárias identificadas as dos ácidos gordos e esteróis, seguidas pelas dos álcoois alifáticos e compostos aromáticos. Alguns destes compostos foram identificados nas formas livre e esterificada, assim como na forma de glicosídeos.

Apesar do aumento acentuado no teor de componentes lipofílicos após hidrólise alcalina sugerir que uma fracção considerável destes compostos deverá estar envolvida em ligações do tipo éster, a quantidade de compostos esterificados detectada por GC-MS nas várias regiões morfológicas não justifica o aumento verificado, particularmente no caso dos ácidos gordos e do ácido ferúlico. Como foi sugerido, estes compostos encontrar-se-ão esterificados em estruturas de elevado peso molecular do tipo cutina e/ou da suberina, não detectáveis por GC-MS.

A grande quantidade de extractáveis lipofílicos nas diferentes partes morfológicas da ‘Dwarf Cavendish’, nomeadamente de ácidos gordos e esteróis, pode constituir um obstáculo à sua utilização industrial, em particular aquando da sua aplicação na produção de pasta e papel. Para além da influência que exercem na qualidade e propriedades da pasta branqueada, a acumulação de extractáveis conduz a um maior consumo de reagentes durante o processo de branqueamento. Além disso, os extractáveis podem dar origem à formação de depósitos no equipamento ou nas pastas, normalmente definidos por *pitch*, provocando bloqueios da produção, o que conduz a um aumento nos custos e à diminuição da qualidade da pasta [234]. Um outro problema associado a estes compostos é o de persistirem nos efluentes resultantes deste tipo de indústria, podendo ter um impacto ambiental negativo quer para a fauna quer para a flora [235].

Dada a grande influência que estes compostos exercem na indústria de pasta e papel, a utilização da bananeira nesta área requer uma maior atenção, de forma a minimizar os problemas a eles associados. Para tal, em estudos futuros, a avaliação do comportamento destas famílias de compostos durante a produção de pasta e papel torna-se importante, nomeadamente durante as etapas de cozimento e branqueamento.

Do ponto de vista dos recursos naturais, as diferentes partes morfológicas da ‘Dwarf Cavendish’ mostraram ser uma fonte muito rica de produtos químicos, nomeadamente de glucosídeos de esterilo. Este tipo de compostos tem sido extensivamente investigado nas últimas décadas devido aos vastos benefícios na saúde.

Nesta perspectiva, o isolamento prévio da fracção lipofílica da bananeira poderá permitir o posterior isolamento da fracção rica em glucosídeos de esterilo, minimizando em simultâneo os eventuais problemas da sua utilização como fonte de fibras e, contribuindo assim para a sua valorização de uma forma mais integrada.

4.3. HEMICELULOSES

4.3.1. ANÁLISE DOS AÇÚCARES NEUTROS

De acordo com os resultados da análise dos açúcares neutros (Tabela 4.15), a composição das hemiceluloses A e B (HA e HB, respectivamente) varia significativamente consoante a parte morfológica em estudo. É de referir que o teor de hemiceluloses foi corrigido para o teor de cinzas, dada a sua elevada concentração nas hemiceluloses isoladas (entre 17 a 23% para as hemiceluloses A e 38 a 50% para as hemiceluloses B, resultantes da precipitação de acetato de potássio no processo de extracção e precipitação das hemiceluloses).

Tabela 4.15. Composição média em monossacarídeos (fracção molar, mol %) nas HA e HB das várias partes morfológicas da ‘Dwarf Cavendish’.

Monossacarídeo	Nervuras/Pecíolos		Limbos		Talo Floral		Bainhas Foliare		Ráquis	
	HA	HB	HA	HB	HA	HB	HA	HB	HA	HB
Ramnose	0,6	0,6	0,4	0,5	0,8	0,4	0,5	0,4	1,5	0,4
Arabinose	16,2	8,7	31,7	5,4	4,2	0,9	27,5	4,1	6,3	1,2
Xilose	77,7	68,8	52,5	40,4	35,1	29,8	57,0	52,3	72,6	50,4
Manose	<0,1	2,0	1,1	6,4	1,6	4,4	0,2	0,9	1,0	2,1
Galactose	2,9	2,9	5,2	2,8	2,3	3,0	6,9	4,1	2,9	4,4
Glucose	2,6	17,0	9,1	44,5	56,0	61,5	7,9	38,2	15,7	41,5

tr: traços

De uma forma geral, a xilose é o monossacarídeo mais abundante na maioria das hemiceluloses das várias partes morfológicas estudadas, representando cerca de 30 a 78% dos açúcares totais, seguido da glucose e da arabinose. A galactose, a ramnose e a manose encontram-se em menores quantidades.

A presença de teores inferiores de arabinose e xilose na hemicelulose B indica que a fracção de polissacarídeos ricos nestes monossacarídeos é facilmente extraída com a solução aquosa de KOH a 5%, enquanto que uma fracção hemicelulósica enriquecida em manose e glucose é preferencialmente extraída com a solução aquosa de KOH a 24%.

De forma a verificar se os processos de extracção foram completos efectuou-se a análise dos monossacarídeos presentes na α -celulose, tendo-se verificado só a presença de 2 a 4% de manose nas α -celuloses das várias partes morfológicas. Este facto pode ser explicado tendo em conta que a fracção de hemicelulose rica em manose é mais difícil de

ser extraída, sendo a sua remoção favorecida por adição de ácido bórico às soluções alcalinas [97].

Comparando as proporções relativas dos vários monossacarídeos, constituintes das hemiceluloses das várias regiões morfológicas, verifica-se que estas variam consoante a parte em estudo, indicando que as hemiceluloses isoladas deverão apresentar estruturas distintas.

Dado que, contrariamente às hemiceluloses das madeiras, nas hemiceluloses das plantas monocotiledóneas, e em particular das gramíneas, existe uma grande variedade de ligações e abundância de ramificações e que dependem das espécies, do tipo e idade do tecido em questão [101], de forma a elucidar um pouco melhor a estrutura das hemiceluloses isoladas foram efectuados os respectivos espectros RMN de ^1H .

4.3.2. ANÁLISE ESTRUTURAL DAS HEMICELULOSES A E B POR RMN DE ^1H

A espectroscopia de RMN é uma ferramenta não-destrutiva importante para a caracterização estrutural dos polissacarídeos. Várias técnicas de RMN de alta-resolução, entre as quais o RMN de ^1H , podem ser usadas para a análise da configuração anomérica e da sequência dos resíduos glicosídicos [236].

Nas Figuras 4.24 e 4.25 apresentam-se os espectros de RMN de ^1H das hemiceluloses A e B (HA e HB), respectivamente. A complexidade observada nos espectros de RMN de ^1H de hemiceluloses dificulta a atribuição dos respectivos sinais, pelo que, num estudo mais aprofundado, a realização de outros métodos de caracterização como a análise por metilação, assim como a realização de outras técnicas de RMN mais avançadas como as técnicas de TOCSY e HSQC, são fundamentais para uma melhor elucidação estrutural das hemiceluloses em estudo [236-238].

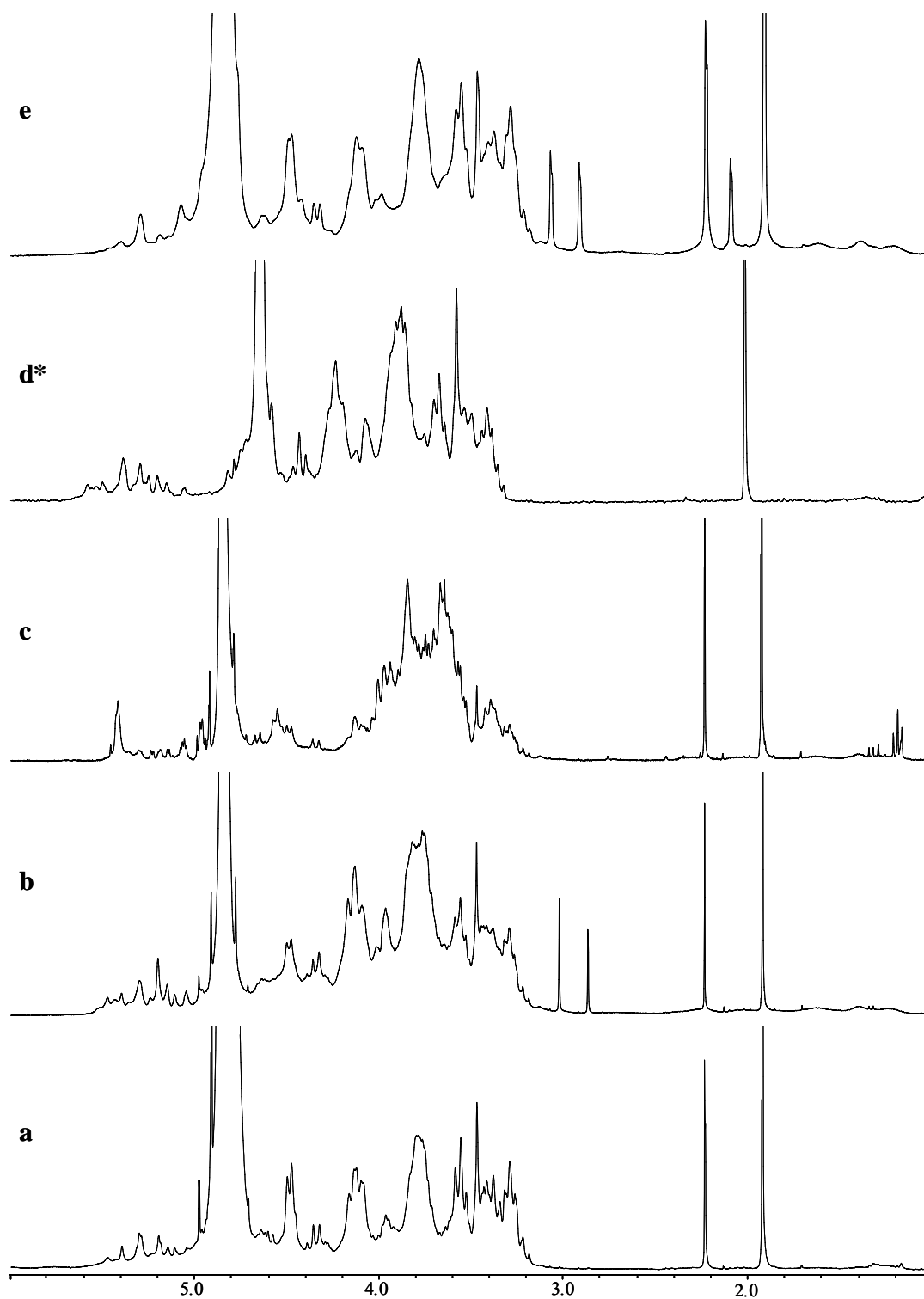


Figura 4.24. Espectros de RMN de ^1H das hemiceluloses A das várias partes morfológicas em estudo: (a) Nervuras/Pecíolos; (b) Limbos; (c) Talo Floral; (d) Bainhas Foliare e (e) Ráquis. * No caso desta amostra, a temperatura de aquisição foi de 60°C .

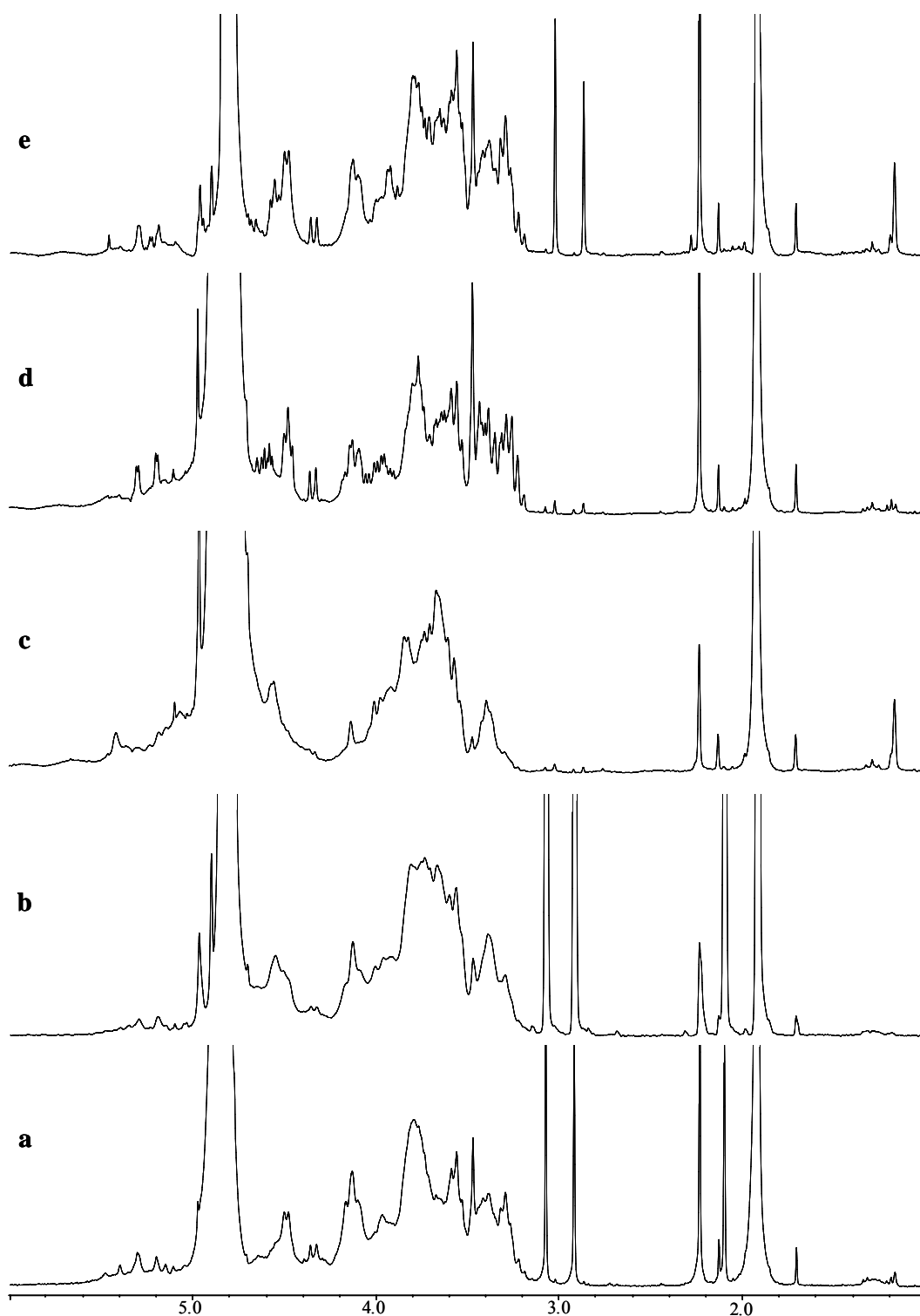


Figura 4.25. Espectros de RMN de ^1H das hemiceluloses B das várias partes morfológicas em estudo: (a) Nervuras/Pecíolos; (b) Limbos; (c) Talo Floral; (d) Bainhas Foliares e (e) Ráquis.

No presente trabalho, e atendendo aos resultados obtidos na análise dos monossacarídeos (Tabela 4.15), a realização dos espectros de RMN de ^1H teve por objectivo tentar compreender um pouco melhor a estrutura das hemiceluloses isoladas. Com base em dados existentes na literatura foi possível efectuar a atribuição de alguns sinais presentes nos respectivos espectros [236,237,239].

No espectro de RMN de ^1H é possível distinguir duas regiões principais: *i*) a região de 3,2 a 4 ppm, correspondente aos prótons dos carbonos C2 a C6 dos vários anéis glicosídicos constituintes das hemiceluloses, na qual a sobreposição de sinais dificulta a sua análise e a atribuição dos respectivos sinais e, *ii*) a região de 4 a 6 ppm, designada região das impressões digitais, na qual são apenas observados os desvios químicos dos prótons anoméricos e, por isso, é vastamente utilizada na elucidação estrutural das hemiceluloses [236-245]. Saliente-se que na região anomérica, as ressonâncias entre 4,9-5,6 ppm referem-se à configuração α [245].

De forma geral, os espectros das várias partes morfológicas apresentam-se semelhantes, com excepção do espectro do talo floral que apresenta algumas diferenças significativas.

Com base nos resultados da análise dos açúcares e dos espectros de ^1H RMN, verifica-se que as hemiceluloses A e B são constituídas por uma mistura de monossacarídeos.

No caso dos resíduos de xilose, que na maioria dos casos é o monossacarídeo maioritário, podem ser observados vários ambientes químicos, dependendo da posição e grau de substituição. Os prótons anoméricos podem ser divididos em quatro tipos de ressonâncias: *i*) terminais redutores (“*reducing end*”) com uma distribuição de equilíbrio entre as conformações α e β ; *ii*) internos sem grupos laterais; *iii*) internos com grupos laterais e, *iv*) terminais não-redutores (“*non-reducing end*”) [239]. Na região anomérica destacam-se os sinais a 5,19, 4,48 e 4,46 ppm correspondentes aos prótons H-1 dos resíduos de α -Xilp redutores, β -Xilp internos e β -Xilp terminais, respectivamente [239]. Outros sinais característicos deste tipo de unidades estão apresentados na Tabela 4.16.

Tabela 4.16. Desvios químicos de RMN de ^1H referentes aos resíduos de xilose [239].

Unidade	Desvios químicos (ppm)					
	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5ax	H-5eq
α -Xilp-red	5,19	3,56	3,76	3,74	3,75	3,83
β -Xilp-int	4,48	3,29	3,56	3,79	3,38	4,10
β -Xilp-term	4,46	3,26	3,43	3,62	3,30	3,97

Estes sinais encontram-se presentes nas hemiceluloses da maioria das partes morfológicas em estudo, com exceção do talo floral no qual surgem com menor intensidade, o que está de acordo com o menor teor em xilose apresentado por esta fracção (Tabela 4.15).

A presença das ressonâncias a 5,29 (H-1), 4,34 (H-5), 3,83 (H-3), 3,59 (H-2), 3,47 (OCH₃) e 3,22 ppm (H-4), correspondentes ao ácido 4-*O*-metil- α -D-glucurónico, para além de sugerir a existência de ácidos urónicos nas amostras em questão, demonstra que as unidades glucuronosil estão essencialmente metiladas em *O*-4 [242,246,247]. Comparando a intensidade dos sinais referentes ao ácido 4-*O*-metil- α -D-glucurónico nas várias partes em estudo, constata-se que este ácido deverá encontrar-se em maior quantidade nas nervuras/peciolos, nos limbos e no ráquis.

Desta forma, um dos heteropolímeros presentes nas hemiceluloses A são as glucuronoxilanas, cuja presença é evidenciada pelos sinais a 5,29 ppm (atribuído ao protão anomérico do MeGlcA), a 4,72 ppm (resultante do protão anomérico de uma unidade Xylp ligada a *O*-2 com MeGlcA e que tem um grupo OAc ligado em *O*-3 ppm), a 5,05 ppm (correspondente ao H-3 na mesma estrutura) e pelos sinais característicos da cadeia de xilanas como os protões H-1 (~4,5 ppm), H-2 (~3,25 ppm), H-3 (~3,55 ppm), H-4 (3,78 ppm) e H-5/5' (3,40/4,10 ppm) (Tabela 4.16) [238,248] (Tabela 4.16).

Contrariamente às restantes hemiceluloses A, a do talo floral apresenta um baixo teor em glucuronoxilanas. Contudo, os sinais a 5,41, 5,22/5,23, 4,97 ppm, atribuídos aos protões anoméricos de unidades de α -D-glucano ramificadas, envolvidas em ligações (1→4) de resíduos de D-glucose com pontos de ramificação em α (1→6), ou seja, de amilopectina, assim como o sinal forte a 3,85 ppm atribuído aos protões H-6/6' evidenciam a presença de amido [237,241]. Estes resultados estão de acordo com os obtidos na composição química, na qual a HA do talo floral apresentou cerca de 2% de amido.

A presença de unidades de arabinofuranose (Araf) é indicada pela presença dos sinais a 5,40 e 4,16 pm, atribuídos ao H-1 e H-2 de resíduos de arabinofuranose com uma ligação α a um O-3 de um resíduo de xilose, respectivamente. Estes sinais encontram-se mais intensos nos espectros das nervuras/pecíolos, limbos e bainhas foliares, o que está de acordo com os teores de arabinose determinados por análise dos açúcares neutros. De acordo com a literatura, outros sinais resultantes desta ligação entre a arabinose e a xilose contribuem para as ressonâncias a 3,91, 4,27, 3,72 e 3,80 ppm correspondentes aos prótons H-3, H-4, H-5ax e H-5eq dos resíduos de arabinofuranose, respectivamente [239]. A identificação destes sinais sugere a presença de arabinoglucuronoxilanas. Além deste tipo de hemicelulose, a fraca intensidade do sinal a 5,40 ppm, atribuído ao H-1 de uma unidade de α -D-Araf terminal (provavelmente das arabinoglucuronoxilanas), não justifica que todas as suas unidades se encontrem em posição terminal quando comparado com o sinal a 3,80 ppm, o que leva a crer que parte das unidades de Araf encontram-se na forma de α -arabinana.

O sinal a 5,43 ppm, atribuído ao H-1 em unidades MeGlcA ramificadas em O-2 com unidades D-Galp, encontra-se presente com maior intensidade nos limbos e nas bainhas foliares, o que vai de encontro com o maior teor de galactose observado nestas partes (Tabela 4.15) [238,248].

Comparando os espectros de RMN de ^1H das hemiceluloses A e B, verifica-se que apresentam algumas diferenças (Figuras 4.24 e 4.25). De acordo com a Tabela 4.15, o teor de glucose nas hemiceluloses B dos limbos, bainhas foliares e ráquis aumenta significativamente, o que é comprovado pelo aparecimento nos respectivos espectros dos sinais a 4,55 e 3,66 ppm, atribuídos aos prótons H-1 e H-3 de um resíduo de (\rightarrow 4)- β -D-Glcp-(1 \rightarrow), respectivamente (Figura 4.25) [236,249].

O elevado teor em glucose e de xilose nas hemiceluloses B sugerem a presença de xiloglucanas que é evidenciado pelo sinal a 4,9 ppm, atribuído ao H-1 de um resíduo terminal de Xylp quando o resíduo de α -D-Xylp está ligado ao O-6 do resíduo β -D-Glcp substituído na posição 6.

Por outro lado, os sinais a 5,10 e 5,20 ppm que são atribuídos aos prótons H-1 da α -Xylp e H-1 da α -Araf, respectivamente, quando estes resíduos encontram-se envolvidos

em cadeias laterais do tipo α -L-Araf-(1 \rightarrow 2)- α -D-Xylp, parecem indicar também a presença de uma fracção de arabinoxiloglucanas nas hemiceluloses B [250].

Embora com menor intensidade, os sinais atribuídos ao amido encontram-se presentes no espectro de RMN de ^1H da HB do talo floral.

Além destas duas regiões, alguns sinais de intensidade significativa surgem entre 0,2 e 3,1 ppm. Os prótons metílicos de alguns grupos acetilo e do ácido 4-*O*-metil-D-glucurónico originam sinais fracos a cerca dos 1,7 e 1,0-1,9 ppm, respectivamente [251].

Os sinais entre 1,2 e 1,3 ppm poderão ser uma indicação da presença de ramnose, surgindo os sinais correspondentes ao H-6 deste monossacarídeo a 1,23 e 1,29 ppm, correspondentes a unidades de ramnose ligadas em C2 e C2/C4, respectivamente. A maior intensidade do sinal a 1,29 ppm indica que a maioria dos resíduos de ramnose contém uma cadeia lateral [240].

Embora uma fracção de grupos acetilo possam ter sido removidos durante o processo de extracção alcalina, os sinais característicos a 2,1 e 2,2 ppm, correspondentes aos prótons dos grupos CH_3 em unidades de xilose acetiladas em *O*-2 e *O*-3, respectivamente, indicam que as hemiceluloses isoladas encontram-se acetiladas em elevada extensão, o que poderá dever-se à acidificação com ácido acético glacial [240,242,248].

4.3.3. CROMATOGRAFIA DE PERMEACÃO EM GEL DAS HEMICELULOSES A E B

Nos cromatogramas de permeação em gel das hemiceluloses isoladas (Figuras 4.26 e 4.27), o pico de eluição principal surge em geral entre os 14 e 18,5 min, surgindo na maioria das hemiceluloses A, um ombro largo adicional entre os 12 e 14,5 min, correspondente a uma fracção de polissacarídeos com um peso molecular médio ponderado (\overline{M}_w) mais elevado ou com uma estrutura mais ramificada e por conseguinte com um volume molar hidrodinâmico superior [237].

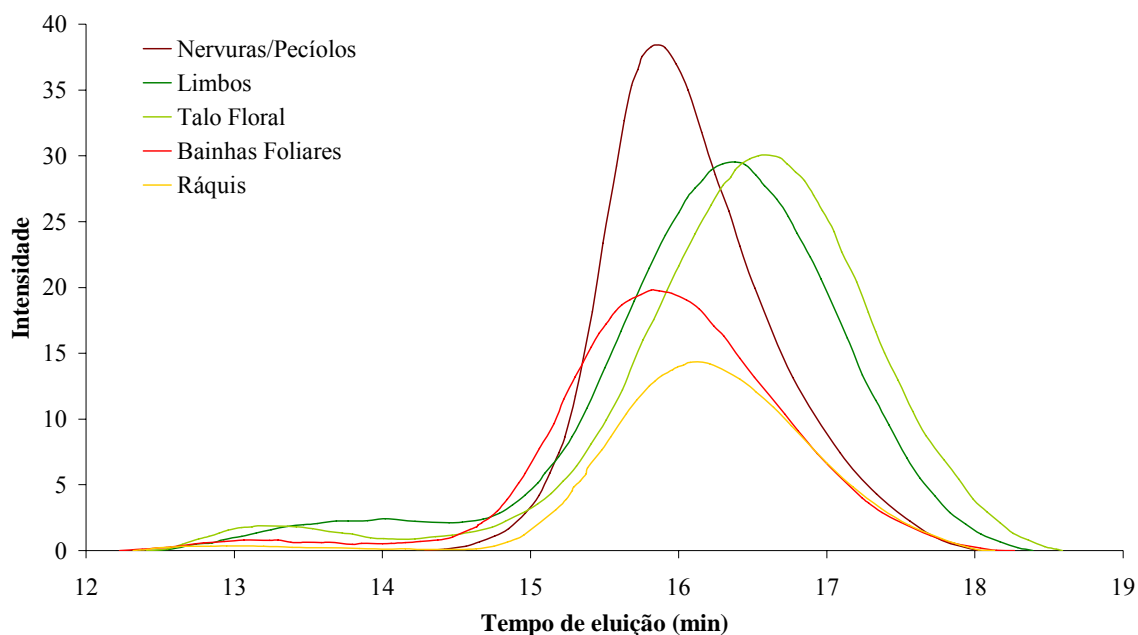


Figura 4.26. Cromatogramas de permeação em gel das hemiceluloses A das várias partes morfológicas da ‘Dwarf Cavendish’.

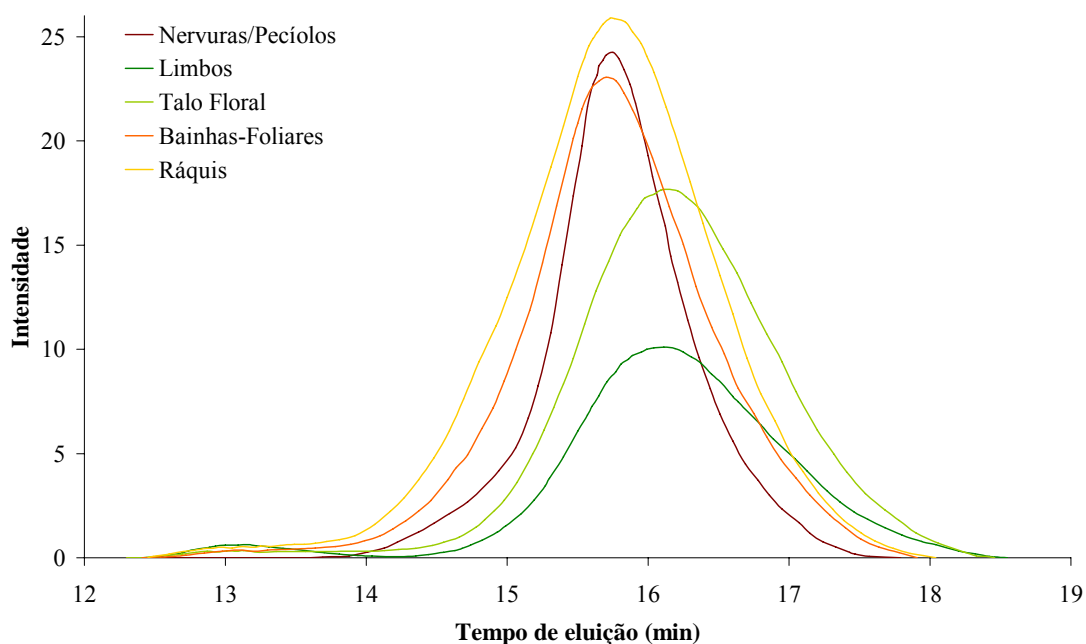


Figura 4.27. Cromatogramas de permeação em gel das hemiceluloses B das várias partes morfológicas da ‘Dwarf Cavendish’.

De acordo com a Tabela 4.17, o peso molecular das hemiceluloses A e B varia significativamente consoante a parte morfológica em estudo, sendo as hemiceluloses das bainhas foliares as que apresentam maior peso molecular.

Comparando os valores obtidos para as hemiceluloses A e B, para uma mesma amostra, constata-se que os pesos moleculares das hemiceluloses B (18600-39700 Da) surgem superiores aos apresentados pelas hemiceluloses A (10700-26600 Da). Este facto sugere que com o tratamento com uma solução de KOH a 5%, os polissacarídeos com peso molecular mais baixo foram dissolvidos enquanto que com a segunda extracção alcalina, com KOH a 24%, não ocorreu uma degradação significativa das hemiceluloses, resultando por conseguinte, na dissolução de hemiceluloses de elevado peso molecular.

Tabela 4.17. Peso molecular médio ponderado das hemiceluloses A e B das várias amostras em estudo (nos cálculos do \overline{M}_w das hemiceluloses A foi incluído apenas o pico de eluição entre os 13.5 e 18.5 min).

Amostra	\overline{M}_w /Da	
	Hemicelulose A	Hemicelulose B
Nervuras/Pecíolos	25 400	28 600
Limbos	14 300	18 600
Talo Floral	10 700	20 300
Bainhas Foliares	26 600	39 700
Ráquis	21 900	30 100

4.3.4. CONCLUSÃO

A análise das hemiceluloses A e B isoladas revela que apresentam estruturas distintas.

A presença de teores inferiores de arabinose e xilose na hemicelulose B indica que a fracção de polissacarídeos ricos nestes monossacarídeos é facilmente extraída com a solução aquosa de KOH a 5%, enquanto que uma fracção hemicelulósica enriquecida em manose e glucose é preferencialmente extraída com a solução aquosa de KOH a 24%.

De acordo com a análise dos monossacarídeos e dos espectros de RMN de ^1H , na maioria das regiões morfológicas, as hemiceluloses A parecem ser constituídas essencialmente por glucuronoxilanas e arabinoglucuronoxilanas enquanto que as hemiceluloses B maioritariamente por xiloglucanas, α -arabinanas e arabinoxiloglucanas. A espectroscopia de RMN de ^1H revela a presença de ácido 4-*O*-metil- α -D-glucurónico nas várias partes em estudo, em particular nas nervuras/pecíolos, nos limbos e no ráquis.

Os resultados obtidos sugerem que o tratamento com KOH a 5% favoreceu a remoção de hemiceluloses de cadeias moleculares mais curtas ($\overline{M}_w = 10-27$ KDa) quando comparado com as hemiceluloses B, que apresentaram pesos moleculares entre 18 e 40 KDa.

Dada a complexidade dos espectros de RMN de ^1H das hemiceluloses A e B isoladas, a realização de técnicas de RMN 2D como é o caso das técnicas de TOCSY e HSQC, assim como a análise por metilação das hemiceluloses, permitiriam a obtenção de mais informações estruturais acerca das hemiceluloses isoladas. Em estudos futuros, a aplicação destas técnicas complementares permitirão uma maior elucidação estrutural dos polissacarídeos das várias fracções da bananeira.

Dada a aptidão das fibras de bananeira na produção de pasta e papel, em estudos futuros o comportamento dos polissacarídeos durante os processos de cozimento e branqueamento deverão ser também avaliados de forma a obter uma optimização do processo.

4.4. LENHINA

A estrutura macromolecular da lenhina é de grande interesse quando se estudam possibilidades de valorização de materiais lenhocelulósicos. A caracterização estrutural da lenhina é importante nos efeitos topoquímicos da manufactura da pasta de papel e na determinação das propriedades das fibras celulósicas [119,252].

De entre as várias aplicações da lenhina, destacam-se a utilização dos seus produtos de oxidação (da vanilina, seringaldeído, catecol, guaiacol, etc.) nas indústrias farmacêuticas, agroquímica, cosmética e alimentar [253,254], assim como a sua conversão em produtos economicamente viáveis, tais como fibra de carbono e adesivos [255,256].

Contudo, devido à sua elevada complexidade macromolecular, a elucidação estrutural da lenhina exige normalmente o recurso a uma variedade de métodos degradativos e técnicas modernas de RMN. Neste trabalho, as lenhinas isoladas para além de terem sido submetidas à análise elementar e à determinação de grupos metoxilo para a elucidação das fórmulas empíricas, foram caracterizadas estruturalmente por pirólise, oxidação com permanganato, oxidação com nitrobenzeno, espectroscopia de FTIR, RMN CP/MAS de ^{13}C , RMN de ^{13}C e ^1H e GPC.

Isolamento da lenhina

O obstáculo principal da elucidação estrutural da lenhina, tal como se apresenta no material lenhocelulósico, é o seu isolamento. O método de isolamento ideal da lenhina deveria fornecer uma lenhina quimicamente pouco modificada, de forma quantitativa e livre de contaminantes [107]. Dada a complexidade estrutural deste biopolímero até aos dias de hoje, nenhum dos métodos existentes preenche estes requisitos. No decurso deste trabalho, dadas as vantagens globais apresentadas pela acidólise suave, o método dioxano foi utilizado no isolamento da lenhina para posterior análise estrutural detalhada. No entanto, para efeitos comparativos procedeu-se ao isolamento da lenhina de Björkman, uma vez que a lenhina obtida por este método apresenta em geral uma estrutura mais preservada relativamente à lenhina dioxano.

4.4.1. CARACTERIZAÇÃO DAS LENHINAS *IN SITU*

A caracterização estrutural da lenhina *in situ*, ou seja, da lenhina no material de partida sem se proceder ao seu isolamento, é um parâmetro importante de comparação relativamente às lenhinas isoladas.

As lenhinas *in situ* das várias partes morfológicas da bananeira foram caracterizadas por dois métodos degradativos: oxidação com permanganato e oxidação com nitrobenzeno (secção 3.6.5). O estudo estrutural da lenhina *in situ* incidiu no material sem (SEA) e com (CEA) pré-extração alcalina (secção 3.6.1.2), uma vez que estes dois tipos de materiais foram usados no isolamento da lenhina para posterior caracterização.

Oxidação com nitrobenzeno

A oxidação com nitrobenzeno, comparado com a oxidação com permanganato das lenhinas, é um método relativamente simples quando aplicado a materiais lenhocelulósicos. Este método converte 20 a 75% da lenhina em fragmentos aromáticos identificáveis, que são maioritariamente uma mistura de aldeídos aromáticos: vanilina, seringaldeído e *p*-hidroxibenzaldeído (Figura 4.28).

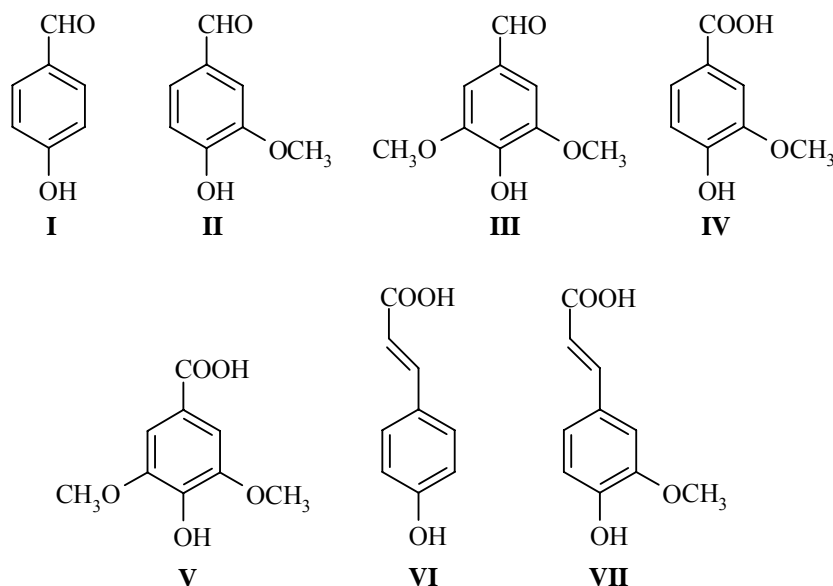


Figura 4.28. Produtos obtidos na oxidação da lenhina *in situ* com nitrobenzeno: I. *p*-Hidroxibenzaldeído; II. Vanilina; III. Seringaldeído; IV. Ácido vanílico; V. Ácido siríngico; VI. Ácido *p*-cumárico e VII. Ácido ferúlico.

As quantidades de cada aldeído na mistura são determinados pela origem e estrutura da lenhina e a sua estimativa é crucial em estudos estruturais [175]. Dado que durante a oxidação com nitrobenzeno, os ácidos *p*-cumárico e ferúlico poderão ser também parcialmente oxidados aos respectivos aldeídos *p*-hidroxibenzaldeído e vanilina, afectando desta forma as proporções das unidades H e G, optou-se por englobá-los no cálculo das respectivas unidades fenilpropanóicas.

Os resultados da análise da oxidação com nitrobenzeno do material de partida SEA e CEA, são apresentados na Tabela 4.18.

Tabela 4.18. Resultados obtidos da oxidação com nitrobenzeno das lenhinas *in situ* do material SEA e CEA (Figura 4.28).

Amostra	Material	Abundância relativa, % molar							$\eta\%^1$	H:G:S
		I	II	III	IV	V	VI	VII		
Nervuras/Pecíolos	SEA	4	31	54	2	5	1	3	27,1	5:36:59
	CEA	2	36	52	3	5	1	1	23,5	3:40:57
Limbos	SEA	5	41	32	7	8	1	6	6,8	6:54:40
	CEA	4	41	37	7	8	1	2	5,9	5:50:45
Talo Floral	SEA	13	38	31	4	4	4	6	6,5	17:48:35
	CEA	12	39	31	7	6	3	2	3,4	15:48:37
Bainhas Foliare	SEA	11	23	58	1	5	1	1	17,2	12:25:63
	CEA	4	20	64	2	7	2	1	16,2	6:23:71
Ráquis	SEA	8	16	64	1	7	3	1	18,3	11:18:71
	CEA	3	17	67	2	8	2	1	17,0	5:20:75

¹ % (m/m), relativamente à percentagem de lenhina de Klason no material SEA e CEA

Os resultados da oxidação com nitrobenzeno obtidos para as amostras da lenhina *in situ* parecem sugerir que as lenhinas dos limbos e do talo floral são mais condensadas que as restantes lenhinas ou então que as unidades de lenhina estão menos acessíveis à oxidação, resultando daí rendimentos substancialmente baixos. Este facto pode estar relacionado com as diferentes funções bem como com o próprio processo de lenhificação nas diferentes regiões morfológicas da planta em estudo.

Da análise dos resultados obtidos pela oxidação com nitrobenzeno, verifica-se que as lenhinas das várias fracções em estudo são do tipo HGS. Analisando as proporções H:G:S verifica-se que nas lenhinas das nervuras/pecíolos, bainhas foliares e ráquis as unidades S

são maioritárias em relação às unidades G, ao contrário do que sucede com as restantes partes. As unidades H encontram-se em maior abundância no talo floral, bainhas foliares e ráquis.

Juntamente com as unidades H, G e S da lenhina, foram detectados teores significativos de ácidos hidroxicinâmicos, em particular de ácido *p*-cumárico e ferúlico. A ocorrência destes ácidos fenólicos nos produtos da oxidação com nitrobenzeno tem sido observada em outras partes de plantas monocotiledóneas, como é o caso da palha de trigo e da abaca (*Musa textilis*) [120,198].

Nos materiais após a extracção alcalina, verifica-se que ocorre uma perda significativa das unidades H não condensadas, em particular nas bainhas foliares e ráquis. Este decréscimo poderá ser atribuído à presença de unidades de ácido *p*-cumárico esterificadas com a lenhina, e cujas ligações são destruídas por hidrólise. Nas nervuras/pecíolos, limbos e talo floral verifica-se uma diminuição significativa do teor de unidades de ácido ferúlico, o que indica que este componente dever-se-à encontrar maioritariamente esterificado na lenhina *in situ*.

Oxidação com permanganato

A informação obtida por este método engloba apenas uma fracção da estrutura total da lenhina uma vez que, apenas podem ser identificadas unidades estruturais com grupos OH fenólico livres (ou unidades terminais) condensadas e não condensadas, previamente protegidas da oxidação por etilação. As restantes unidades são destruídas durante a oxidação e subsequentemente eliminadas [177]. Apesar de apenas as unidades fenólicas livres serem acessíveis a esta análise (25-35% da totalidade das unidades), considera-se que esta fracção de lenhina reflecte as principais características da totalidade da lenhina [177,257].

A análise por oxidação com permanganato das lenhinas *in situ* no material SEA e CEA permitiu a identificação e quantificação de 9 ésteres metílicos de ácidos carboxílicos (Figura 4.29, Tabela 4.19).

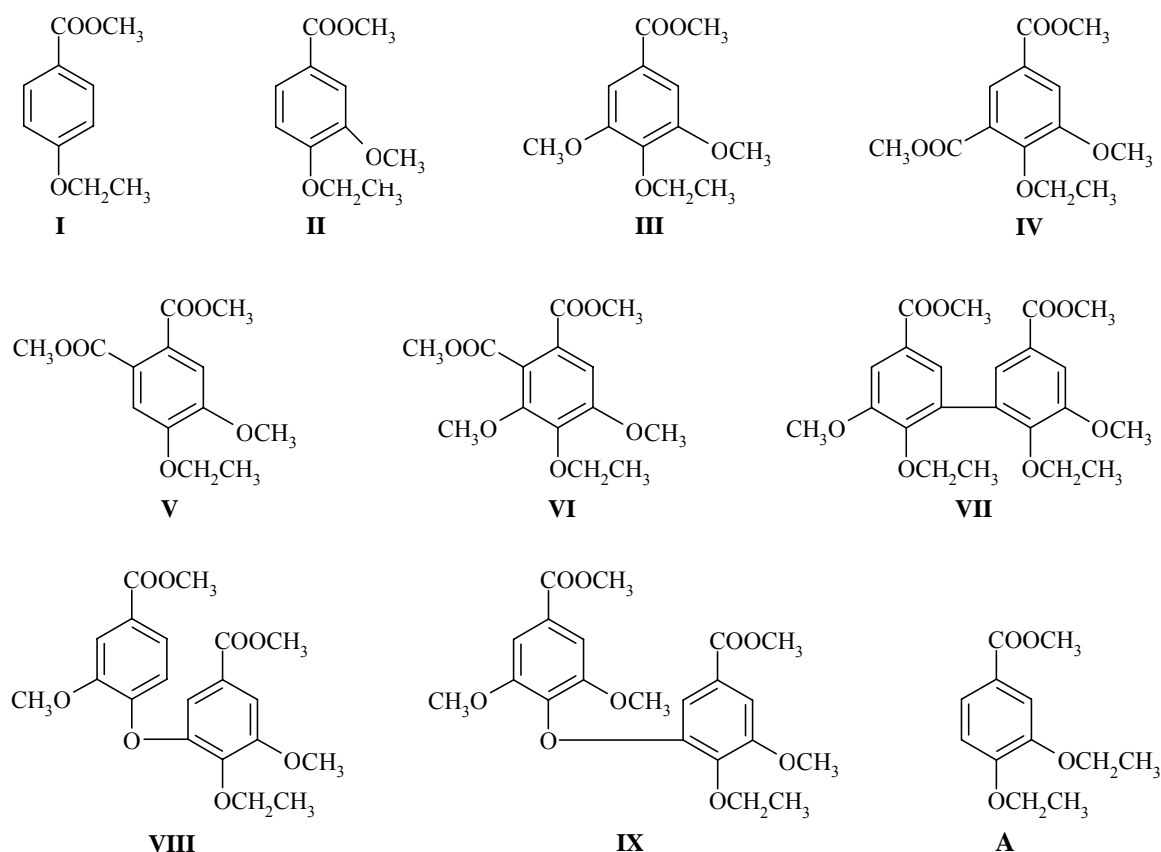


Figura 4.29. Ésteres metílicos dos produtos da oxidação da lenhina *in situ* com permanganato.

Os ésteres metílicos dos ácidos *p*-hidroxibenzoico **I**, vanílico **II** e serínico **III** são provenientes das unidades estruturais não condensadas do tipo H, G e S, respectivamente [177], contribuindo ainda para a proporção das unidades H, as estruturas do tipo cumarato que originam, após a oxidação com permanganato, o produto **I**. As estruturas do tipo fenilcumarano dão origem ao produto **IV** e os ésteres dos ácidos dicarboxílicos **V** e **VI** são atribuídos a estruturas do tipo isolariciresinol, cujas unidades estão envolvidas por ligações α -6 e β - β [258]. Os produtos **V** e **VI** podem também ser atribuídos a unidades envolvidas em ligações do tipo β -6 e γ -O- α (estruturas do tipo fenilisocromano) [259]. As estruturas condensadas do tipo bifenilo 5-5' **VII** e éter diarílico 4-O-5' **VIII** e **IX** resistem à oxidação com permanganato, ocorrendo apenas a destruição das cadeias laterais, originando ácidos dicarboxílicos. Contrariamente aos restantes produtos, a estrutura **A** não resulta da degradação oxidativa da lenhina, sendo característica da presença de taninos condensados do tipo catequina.

A oxidação com permanganato é um método frequentemente utilizado em estudos estruturais da lenhina [177]. Para além da informação relativa à frequência de cada produto e do rendimento dos ácidos carboxílicos aromáticos, que fornece uma indicação da reactividade e do grau de polimerização de uma lenhina em particular, é também possível determinar a razão H:G:S e a razão entre estruturas não condensadas e estruturas condensadas (nC:C).

Os resultados da oxidação com permanganato (Tabela 4.19) demonstram que existem diferenças estruturais relevantes entre as lenhinas das várias partes morfológicas da bananeira, evidenciadas pela abundância relativa de cada produto quantificado e pela proporção H:G:S, bem como a relação nC:C.

Tabela 4.19. Resultados da oxidação com permanganato das lenhinas *in situ* do material SEA e CEA (Figura 4.29).

		Abundância Relativa, % molar											
Amostra	Material	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	$\eta\%$ ¹	H:G:S	nC:C
Nervuras/ Pecíolos	SEA	25	53	7	5	2	1	4	1	2	10,2	25:66:9	85:15
	CEA	20	52	9	7	3	1	4	2	2	6,6	20:69:11	81:19
Limbos	SEA	18	54	6	7	1	5	6	1	2	8,8	18:70:12	78:22
	CEA	19	50	6	7	1	8	6	1	2	6,2	19:66:15	75:25
Talo Floral	SEA	31	40	4	8	1	7	8	1	<0,5	9,0	31:58:11	75:25
	CEA	36	37	5	6	2	8	4	1	1	5,0	36:50:14	78:22
Bainhas Foliares	SEA	46	31	6	6	<0,5	2	7	1	1	13,1	46:46:8	83:17
	CEA	35	36	9	5	2	4	5	2	2	7,3	35:51:14	80:20
Ráquis	SEA	53	24	10	4	1	1	4	1	2	9,7	53:35:12	87:13
	CEA	20	43	16	6	3	2	5	2	3	8,8	20:60:20	79:21

¹ % (m/m), relativamente à percentagem de lenhina de Klason presente no material SEA e CEA

A elevada proporção de unidades G, em particular na lenhina dos limbos, evidencia a abundância deste tipo de unidades contendo um grupo fenólico livre, em contraste com as unidades S. De igual modo, o teor de unidades H com grupo hidroxilo fenólico livre é significativamente elevado, em especial nas lenhinas das bainhas foliares e do ráquis. O decréscimo acentuado verificado no teor de unidades H após a extracção alcalina no ráquis dá indicação da existência de ligações éster entre a lenhina e unidades de ácido *p*-cumárico no material inicial, confirmando o observado pela oxidação com nitrobenzeno.

As proporções H:G:S obtidas por oxidação das lenhinas *in situ* com permanganato de potássio em comparação com as obtidas por oxidação com nitrobenzeno, revelam teores muito inferiores de unidades S e valores superiores de unidades G e H. A diferença observada entre estes dois métodos deve-se essencialmente:

i) às unidades S serem subestimadas pelo método da oxidação com permanganato, devido aos grupos OH fenólicos livres não se encontrarem equitativamente distribuídos entre as unidades H, G e S, sendo os grupos hidroxilo fenólico livres mais frequentes nas unidades H e G do que nas unidades S, que se encontram em geral na forma eterificada;

ii) à sobrevalorização das unidades S na oxidação com nitrobenzeno devido: a) às unidades H, G e S, possuindo os mesmos grupos substituintes, originarem diferentes quantidades de aldeídos após a oxidação com nitrobenzeno, conforme a capacidade do anel aromático para fornecer electrões ao carbono benzílico, sendo maior para as unidades S e menor para as unidades H e b) devido a impedimentos estereoquímicos que tornam mais provável o envolvimento das unidades G e H em estruturas condensadas não degradáveis na oxidação com nitrobenzeno [116,260,261].

O teor relativo dos produtos **IV-IX** obtidos na oxidação com permanganato das nervuras/pecíolos, das bainhas foliares e ráquis (13-20%) indica que o grau de condensação da lenhina destas três partes morfológicas é inferior às restantes, o que vai de encontro com os resultados obtidos na oxidação com nitrobenzeno. Comparativamente a outras plantas anuais, como é o caso da *Arundo donax* e *Hibiscus cannabinus*, a lenhina *in situ* do material sem extracção alcalina, das várias partes morfológicas da bananeira, apresenta-se mais condensada [262,263]. Contudo, após a extracção alcalina, e tal como verificado na caracterização da lenhina *in situ* do Kenaf [262], a proporção de unidades condensadas aumenta na maioria das fracções, sendo esse aumento mais significativo para o ráquis.

A frequência de estruturas condensadas indica que cerca de 46-64% da totalidade das unidades estruturais condensadas da lenhina estão ligadas por ligações β -5, β -6 e α -6, sendo estas mais relevantes nas nervuras/pecíolos e talo floral. Após o material ser submetido à extracção alcalina verifica-se um ligeiro aumento no teor destas estruturas, o qual é mais notório no ráquis. Esta observação parece indicar que, após a extracção alcalina, as estruturas envolvidas neste tipo de ligações com um grupo hidroxilo livre tornam-se mais acessíveis à oxidação com permanganato. As estruturas do tipo bifenilo **VII** são também abundantes representando cerca de 18-41% das estruturas condensadas,

sendo a sua contribuição mais significativa no caso das bainhas foliares. As estruturas do tipo éter diarílico **VIII** e **IX**, que representam cerca de 4-24% das estruturas condensadas, são mais abundantes nas nervuras/pecíolos e ráquis.

A protecção dos grupos hidroxilo fenólico livres através da etilação (Secção 3.6.5.5) permitiu a detecção do composto **A** nos produtos de oxidação das várias lenhinas *in situ* que, tal como referido, indica a presença de taninos condensados como a catequina. Este composto foi detectado nas amostras sem extracção alcalina, em cerca de 2-11%, sendo os limbos e o talo floral as fracções mais contaminadas.

Os rendimentos obtidos na oxidação com permanganato das lenhinas *in situ* encontram-se abaixo dos obtidos em outras plantas anuais [262,263], o que poderá ser uma indicação de um teor baixo de grupos hidroxilo fenólico livres na planta em estudo. Após a extracção alcalina, verifica-se um decréscimo no rendimento da oxidação, o que sugere que durante a extracção alcalina é removida uma fracção de compostos fenólicos com grupos hidroxilo livres, o que é comprovado pela diminuição do teor em unidades H. Este facto vai ao encontro da diminuição no teor em unidades H observado na maioria das partes morfológicas em estudo (Tabela 4.19).

4.4.2. CARACTERIZAÇÃO DAS LENHINAS DE BJÖRKMAN

Com o objectivo de isolar a lenhina das diferentes partes morfológicas, procedeu-se à extracção das mesmas pelo método de Björkman (secção 3.6.1.1). As lenhinas de Björkman serão designadas por LB+ Iniciais das Partes Morfológicas: LB_{NP} – Lenhina de Björkman das **N**ervuras/**P**ecíolos; LB_L - Lenhina de Björkman dos **L**imbos; LB_{TF} - Lenhina de Björkman do **T**alo **F**loral; LB_{BF} - Lenhina de Björkman das **B**ainhas **F**oliares e LB_R - Lenhina de Björkman do **R**áquis.

É conhecido que usando este método de isolamento nas monocotiledóneas é mais difícil de obter uma lenhina relativamente pura e com rendimentos elevados do que nas madeiras folhosas e resinosas [264]. Quando este método é aplicado a materiais não-lenhosos, as lenhinas isoladas apresentam-se normalmente contaminadas com grandes quantidades de hidratos de carbono [111]. Na Tabela 4.20 apresentam-se os rendimentos das lenhinas de Björkman isoladas.

Assim, os baixos rendimentos de extracção obtidos, em especial para as bainhas foliares, indicam que apenas uma pequena fracção de lenhina foi isolada por este procedimento (Tabela 4.20).

Tabela 4.20. Rendimentos de extracção das lenhinas de Björkman.

Lenhina	Rendimento, %¹
LB _{NP}	4,2
LB _L	4,2
LB _{TF}	1,1
LB _{BF}	0,8
LB _R	4,0

¹%, relativamente à lenhina de Klason determinada no material sem extractáveis

Atendendo aos baixos rendimentos obtidos e, provavelmente à consequente falta de representatividade das amostras isoladas, não foi efectuada a caracterização estrutural exhaustiva destas lenhinas. As lenhinas de Björkman das amostras foram caracterizadas por espectroscopia de RMN CP/MAS de ¹³C, por Pirólise acoplada a GC-MS e por GPC.

Espectroscopia de RMN CP/MAS de ¹³C

Apenas as lenhinas de Björkman das amostras obtidas em maior quantidade (Nervuras/Pecíolos **LB_{NP}**, Limbos **LB_L** e Ráquis **LB_R**) foram analisadas por RMN CP/MAS de ¹³C.

Da análise dos espectros de RMN CP/MAS de ¹³C (Figura 4.30) verifica-se que as lenhinas de Björkman isoladas se encontram contaminadas em elevada extensão por substâncias alifáticas (9-46 ppm) e hidratos de carbono (64, 73, 101, 172 ppm).

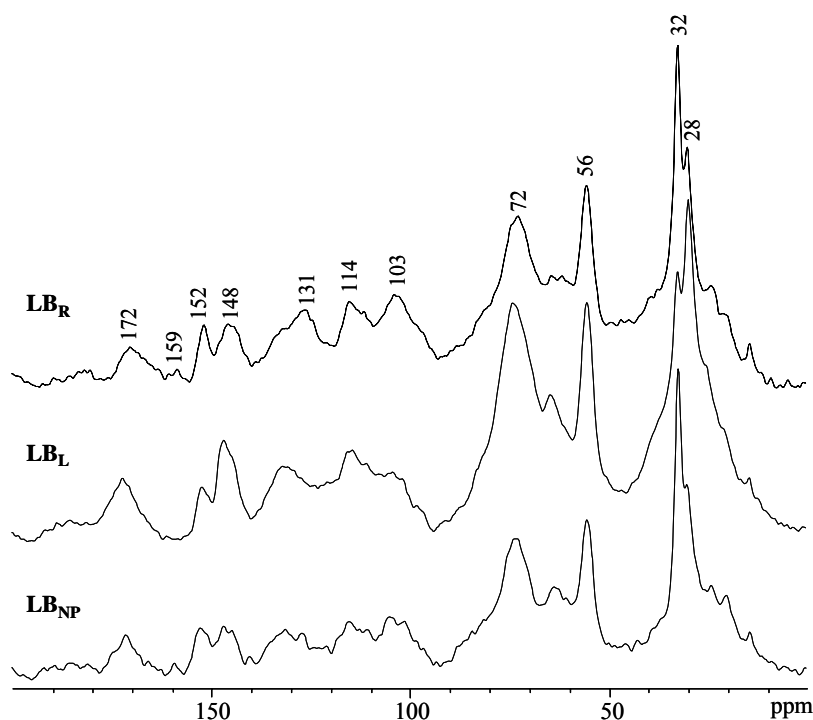


Figura 4.30. Espectros de RMN CP/MAS ^{13}C das lenhinas de Björkman.

Dos sinais característicos da lenhina (Tabela 4.21), verifica-se que, comparando as intensidades dos sinais a 103 e 114 ppm, nos espectros das várias partes morfológicas, a razão G/S será superior nos limbos. Por outro lado, a lenhina **LB_{NP}** e a **LB_R** deverão apresentar razões G/S inferiores, dado que a intensidade destes dois sinais é muito próximo. O sinal atribuído à unidade H, embora não seja observável no espectro da **LB_L**, está presente nos espectros da **LB_{NP}** e da **LB_R**, sugerindo que estas duas partes morfológicas deverão apresentar um teor superior deste tipo de unidades.

É de referir que, no sinal a 73 ppm, dada a sua elevada intensidade, a contribuição do C α -OH nas ligações β -O-4 da lenhina deverá ser mínima, pelo que a contribuição maioritária dever-se-à aos hidratos de carbono.

Um outro sinal relevante nos espectros apresentados é o ombro presente a 144 ppm. Tendo por base que os taninos de madeiras produzem um sinal proeminente neste desvio químico, a sua presença nos espectros apresentados sugere que os compostos polifenólicos condensados e co-extraídos com a lenhina apresentam uma contribuição significativa nesta região espectral [190]. Este facto vai ao encontro da discussão anterior sobre a detecção do composto **A** na análise por oxidação com permanganato da lenhina *in situ*. Dado que este

tipo de compostos pode interferir na análise estrutural das lenhinas isoladas, a sua presença deve ser minimizada, o que poderá ser possível através da realização de uma extracção alcalina prévia ao material lenhocelulósico [162].

Tabela 4.21. Atribuição dos principais sinais de RMN de ^{13}C de estado sólido de lenhinas, com base em estudos prévios [183,185,186,190].

δ (ppm)	Atribuição
56	OCH_3 aromático
72-74	$\text{C}_\alpha\text{-OH}$ nas ligações $\beta\text{-O-4}$
84	C_β em cadeias laterais envolvidas em ligações $\beta\text{-O-4}$
103	C_2, C_6 , unidades S
114	C_5 , unidades G
131	C_1, C_4 , unidades S eterificadas; C_1 , unidades G eterificadas
148	C_3, C_5 , unidades S não eterificadas; C_3, C_4 , unidades G
152	C_3, C_5 , unidades S eterificadas
159	C_4 , unidades H

Apesar da sua elevada contaminação em extractáveis e hidratos de carbono, de forma a obter mais informação estrutural das lenhinas isoladas, e atendendo às pequenas quantidades de lenhina de Björkman obtidas, as amostras foram analisadas por Pirólise-GC/MS (secção 3.6.5.3).

Pirólise acoplada a GC/MS

A Pirólise acoplada a GC/MS é conhecida por ser uma técnica de análise muito útil na caracterização da lenhina. Deste modo, com base nas áreas dos picos dos produtos derivados das unidades H, G e S, a lenhina pode ser facilmente classificada de acordo com a sua proporção H:G:S [167,168]. É de referir que, tal como sucede com a oxidação com nitrobenzeno, a pirólise sobrestima o teor em unidades seringilo [265,266].

A título de exemplo, e tendo em conta a semelhança em termos do número de sinais, apresenta-se, na Figura 4.31, o pirograma da lenhina de Björkman das nervuras/pecíolos **LB_{NP}**. A atribuição dos picos encontra-se na Tabela 4.22 e foi feita por comparação dos seus espectros de massa com os existentes na literatura [167-173].

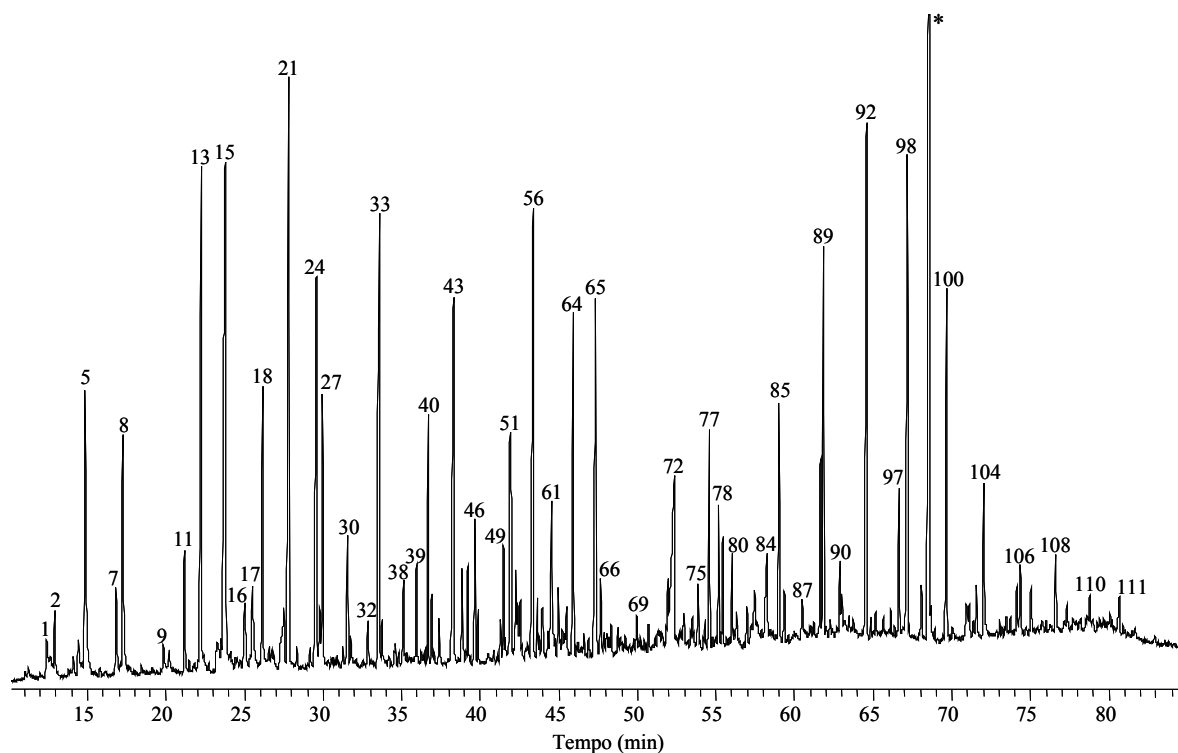


Figura 4.31. Pirograma referente à lenhina de Björkman das nervuras/pecíolos LB_{NP} (*contaminação pelo solvente).

Os produtos de pirólise identificados derivam maioritariamente de unidades de lenhina, embora tenham sido identificados alguns compostos referentes a extractáveis e hidratos de carbono (Tabela 4.23).

De entre os derivados da lenhina detectados, destacam-se, em termos gerais e pela sua quantidade, o 4-metilguaiacol **13**, o 4-vinilfenol **15**, o 4-vinilguaiacol **21**, o seringol **24**, o 4-vinilseringol **43** e o *trans*-4-propenilseringol **56**.

Embora o fenol **1** e cresol **6** detectados possam provir da degradação de unidades de tirosina, indicativa da presença de proteínas, estes compostos deverão resultar maioritariamente da degradação de unidades *p*-hidroxifenilpropano (H), as quais se encontram em quantidades significativas nas plantas monocotiledóneas [267]. Deste modo, estes dois compostos foram contabilizados no cálculo da proporção das unidades H (Tabela 4.22).

Tabela 4.22. Quantidade relativa (%) dos produtos identificados por pirólise das lenhinas de Björkman [167-173].

Pico no.	Composto	Tipo	LB _{NP}	LB _L	LB _{TF}	LB _{BF}	LB _R
LENHINA			50,0	48,3	59,3	60,1	58,9
1	Fenol	H	0,4	0,1	0,9	3,7	0,3
6	<i>o</i> -Cresol	H	0,1	n.d.	0,2	0,7	n.d.
7	<i>m/p</i> -cresol	H	0,8	0,6	1,7	3,3	0,6
8	Guaiacol	G	2,0	2,2	3,6	8,0	0,9
11	4-Etilfenol	H	0,9	0,3	2,0	1,3	1,9
12	3-Metilguaiacol	G	0,1	<0,1	0,2	<0,1	<0,1
13	4-Metilguaiacol	G	4,0	6,0	7,3	2,3	2,1
15	4-Vinilfenol	H	7,8	1,7	11,8	8,1	18,9
18	4-Etilguaiacol	G	1,8	2,0	3,0	2,4	1,2
21	4-Vinilguaiacol	G	5,9	7,6	4,9	17,2	5,7
23	4-Propenilfenol (<i>trans</i>)	H	0,1	0,1	0,2	<0,05	0,1
24	Seringol	S	3,6	2,3	3,4	2,4	2,6
25	Eugenol	G	<0,1	<0,1	0,2	n.d.	0,3
28	4-Propilguaiacol	G	<0,1	<0,1	0,2	<0,1	<0,1
30	Vanilina	G	1,2	1,6	0,9	1,8	0,7
31	Isoeugenol (<i>cis</i>)	G	0,1	0,2	0,2	n.d.	<0,1
33	Isoeugenol (<i>trans</i>)+4-metilsiringol	G+S	1,7	4,6	4,1	1,1	3,6
34	Derivado G	G	0,2	0,9	0,9	n.d.	0,2
36	Derivado G	G	0,1	0,4	0,2	n.d.	<0,1
37	4-Propinilseringol	S	0,1	0,2	<0,1	n.d.	<0,1
38	Acetoguaiacona	G	0,7	1,2	0,8	0,5	0,5
40	4-Etilsiringol	S	1,6	1,0	1,3	0,5	1,6
41	Acetona guaiacilo	G	0,5	0,6	0,1	0,4	0,2
42	Derivado G	G	0,4	0,7	0,5	<0,1	0,3
43	4-Vinilsiringol	S	3,5	2,8	1,2	1,4	4,4
46	4-Alilsiringol	S	0,8	0,5	0,7	0,5	1,0
47	4-Propilsiringol	S	0,3	0,1	0,4	n.d.	0,3
48	Derivado G	G	0,3	0,8	0,8	0,4	0,2
49	4-Propenilsiringol (<i>cis</i>)	S	0,7	0,3	0,5	0,2	0,8
52	Seringaldeído	S	0,8	4,7	0,6	0,6	1,1
54	Derivado S	S	0,4	<0,1	n.d.	n.d.	n.d.
55	4-propinilseringol	S	0,3	0,1	0,2	n.d.	0,3
56	4-propenilsiringol (<i>trans</i>)	S	4,3	2,2	3,6	1,8	4,7
61	Coniferaldeído+Acetoseríngona	G+S	1,3	1,1	0,4	0,6	1,0
62	Derivado G	G	0,4	0,2	0,8	n.d.	0,2
64	Acetona seringilo	S	2,6	1,0	1,2	0,6	2,4
66	Propioseringona	S	0,5	0,3	0,2	0,2	0,9
H:G:S			20:38:42	6:56:38	28:45:27	28:57:15	37:25:38
n.d. – não detectado							

Comparando as proporções H:G:S obtidas para as várias partes morfológicas em estudo, verifica-se que as lenhinas de Björkman isoladas são do tipo HGS, sendo a **LB_{TF}**, **LB_{BF}** e **LB_R** as que apresentam um teor mais elevado de unidades H, a **LB_L** e a **LB_{BF}** em unidades G e a **LB_{NP}**, **LB_L** e **LB_R** em unidades S. Os resultados obtidos para as lenhinas das nervuras/pecíolos, limbos e ráquis são concordantes com os sugeridos pela análise dos espectros de RMN CP/MAS de ¹³C.

Embora as proporções H:G:S das lenhinas *in situ* e das lenhinas de Björkman caracterizadas por Py-GC/MS tenham valores diferentes, no que se refere à abundância das unidades H e S verifica-se a mesma tendência. De entre as várias lenhinas de Björkman isoladas, dada a proximidade entre as proporções H:G:S obtidas pelos vários métodos, a lenhina **LB_L** aparenta ser a mais representativa da lenhina *in situ*.

Como referido, simultaneamente com os resíduos de lenhina, foram detectados ainda compostos derivados dos contaminantes existentes em grande quantidade nas lenhinas de Björkman, como é o caso dos compostos alifáticos, nomeadamente os ácidos hexadecanóico **72** e octadecanóico **106** assim como o tricosano **89**, o tetracosano **92**, o pentacosano **98** e o hexacosano **100** e dos compostos derivados de hidratos de carbono e/ou de lenhina modificada (Tabela 4.23).

Tabela 4.23. Quantidade relativa (%) dos produtos identificados por pirólise das lenhinas de Björkman [167-173].

Pico no.	Composto	LB _{NP}	LB _L	LB _{TF}	LB _{BF}	LB _R
EXTRACTÁVEIS		22,8	13,3	13,2	17,2	16,0
63	Ácido n-tetradecanóico	<0,1	<0,1	<0,1	0,2	0,5
68	Ácido n-pentadecanóico	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
72	Ácido n-hexadecanóico	3,1	3,7	7,2	2,1	4,1
73	Eicosano	0,2	n.d.	<0,1	n.d.	0,2
80	Heneicosano	0,6	0,3	0,1	n.d.	0,5
83	Ácido 9-octadecenóico	0,6	0,7	n.d.	n.d.	n.d.
84	Ácido n-octadecanóico	1,0	1,4	n.d.	1,0	1,2
85	Docosano	1,6	0,5	0,5	n.d.	1,4
89	Tricosano	3,0	0,8	0,6	n.d.	2,1
92	Tetracosano	4,2	1,3	0,9	n.d.	2,4
98	Pentacosano	3,7	1,4	0,9	n.d.	1,5
100	Hexacosano	2,6	1,4	0,7	n.d.	0,5
104	Heptacosano	1,1	0,9	0,4	n.d.	0,4
106	Octacosano	0,5	0,4	0,5	4,2	0,4
108	Nonacosano	0,5	0,5	0,8	8,3	0,5
110	Triacotano	0,2	n.d.	0,5	1,4	0,2
HIDRATOS DE CARBONO/ LENHINA MODIFICADA		4,0	2,0	2,1	3,4	2,8
2	4-hidróxi-5,6-desidro-(2H)-piran-2-ona	0,5	0,4	n.d.	1,3	0,3
14	Catecol	<0,1	<0,1	0,5	2,1	0,4
17	3-metóxicatecol	0,7	0,3	0,4	n.d.	0,8
19	4-metilcatecol	0,3	0,4	0,4	n.d.	<0,1
26	5-etilpirogallol	0,4	0,2	0,4	n.d.	0,3
27	2-ter-butil- <i>m</i> -cresol	1,5	0,5	0,2	n.d.	0,7
45	2-metiltiobenzotiazol	0,6	0,2	0,2	<0,1	0,3
COMPOSTOS NÃO IDENTIFICADOS		24,3	36,1	25,6	20,5	22,9

n.d. – não detectado

Cromatografia de Permeação em Gel

Numa primeira análise dos cromatogramas de GPC das lenhinas de Björkman isoladas (Figura 4.32), verifica-se que a maioria delas apresenta uma distribuição bimodal (com excepção da **LB_L** e **LB_{TF}**), o que pode ser justificado atendendo à elevada contaminação por extractáveis e hidratos de carbono apresentada por estas fracções aromáticas. O pico de eluição principal surge em geral entre os 15 e 20 min, com excepção da **LB_{BF}**, na qual surge entre os 17 a 21 min. No caso das lenhinas **LB_{NP}** e **LB_R**, estas apresentam um ombro com um máximo a cerca de 16 min, que corresponde a fracções de compostos com um peso molecular médio ponderado (\overline{M}_w) mais elevado ou com uma estrutura mais ramificada e por conseguinte com um volume molar hidrodinâmico superior.

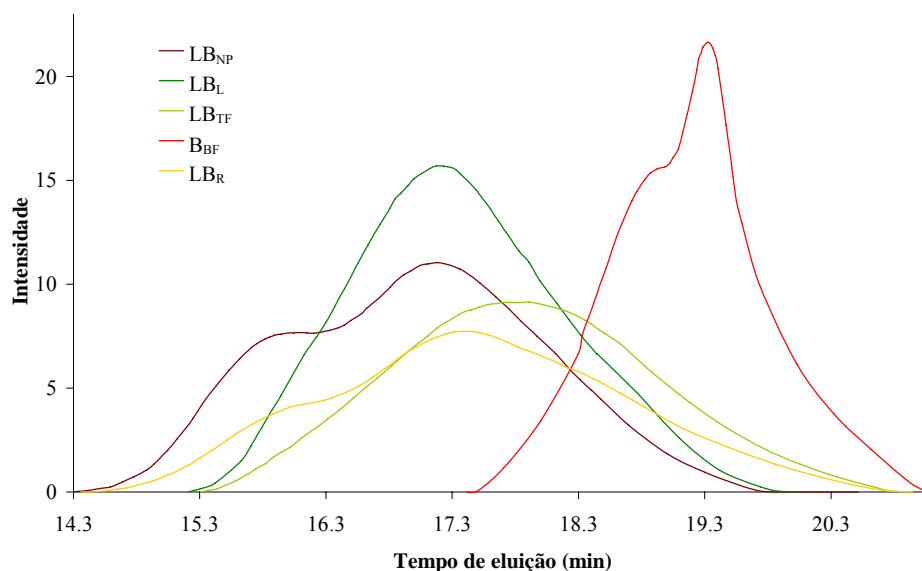


Figura 4.32. Cromatogramas de permeação em gel das lenhinas de Björkman.

Os resultados obtidos e apresentados na Tabela 4.24 mostram que o peso molecular das lenhinas de Björkman varia significativamente consoante a parte morfológica em estudo, sendo a fracção das nervuras/pecíolos a que apresenta maior peso molecular ponderado.

Tabela 4.24. Peso molecular médio ponderado (\overline{M}_w) das lenhinas de Björkman.

Lenhina	\overline{M}_w (Da)
LB _{NP}	3300
LB _L	2300
LB _{TF}	1800
LB _{BF}	750
LB _R	2400

Embora os métodos de caracterização anteriores tenham permitido obter alguma informação estrutural das lenhinas de Björkman isoladas, atendendo aos baixos rendimentos e à elevada extensão de contaminação das mesmas, por extractáveis e hidratos de carbono, conclui-se que o método de Björkman, no caso da ‘Dwarf Cavendish’, não é o mais apropriado para a obtenção de uma lenhina representativa e passível de caracterização estrutural posterior. Por esse facto, optou-se por adoptar o método de acidólise como método de isolamento da lenhina da ‘Dwarf Cavendish’ para posterior caracterização estrutural [159].

4.4.3. CARACTERIZAÇÃO DAS LENHINAS DIOXANO

Com vista a otimizar o procedimento de isolamento por acidólise da lenhina para análise estrutural, em especial para o caso das madeiras, alguns autores sugeriram algumas alterações quer a nível da preparação do material quer do procedimento de isolamento propriamente dito [162,267]. Apesar destas alterações terem sido aplicadas a outras plantas de crescimento rápido, como a *Hibiscus cannabinus* [262] e a *Arundo donax* [263], o efeito produzido na estrutura da lenhina deste tipo de plantas não foi devidamente estudado. Deste modo, atendendo a que as lenhinas das monocotiledóneas apresentam características estruturais distintas comparativamente às das madeiras e a informação existente relativamente às propriedades das lenhinas de monocotiledóneas do género *Musa* é escassa, optou-se por estudar de uma forma mais pormenorizada os efeitos provocados pela:

- i) introdução do passo de extracção alcalina prévia, o qual tem como objectivo remover compostos fenólicos (nomeadamente taninos) que afectam a determinação de alguns parâmetros de caracterização da lenhina [162];
- ii) alteração do método original de acidólise [159], pela realização de várias extracções com renovação da mistura dioxano/água/ácido clorídrico, em substituição de uma única extracção, com vista a aumentar o rendimento de lenhina assim como minimizar a ocorrência de reacções de condensação [162,262,263,267].

Com base nos últimos trabalhos publicados relativos ao isolamento e caracterização de lenhinas, adoptou-se inicialmente o método descrito por Evtuguin e outros [267] (secção 3.6.1.3). A discussão dos resultados referente à caracterização das lenhinas dioxano das várias partes morfológicas da ‘Dwarf Cavendish’ foi iniciada com as lenhinas isoladas a partir do material com extracção alcalina (CEA) e pelo método de acidólise modificado.

Atendendo aos resultados obtidos neste estudo, optou-se por estudar o efeito da pré-extracção alcalina assim como das alterações feitas ao método de acidólise na pureza e estrutura das lenhinas isoladas.

Deste modo, o sub-capítulo de caracterização estrutural das lenhinas dioxano encontra-se dividido em duas partes:

Parte I. Nesta parte foram isoladas lenhinas das várias partes da bananeira em estudo pelo método de acidólise modificado (secção 3.6.1.3), tendo sido o material de partida

sujeito a uma pré-extracção alcalina (CEA). Dado que as lenhinas isoladas e purificadas apresentaram-se contaminadas por compostos alifáticos, foram sujeitas a uma extracção com clorofórmio. O efeito desta extracção na estrutura das lenhinas extraídas foi estudado. As lenhinas purificadas e submetidas a este processo foram designadas por **LD_{ne}** (Lenhina Dioxano **n**ão extraída com clorofórmio) e **LD_e** (Lenhina Dioxano extraída com clorofórmio).

Parte II. De forma a estudar o impacto da extracção alcalina bem como do método de acidólise na estrutura das lenhinas dioxano, nesta parte, foram preparados dois tipos de material: *i)* **SEA**: material previamente extraído com etanol/tolueno e água e *ii)* **CEA**: material previamente extraído com etanol/tolueno e água e sujeito a uma pré-extracção alcalina. Estes dois materiais foram sujeitos ao método de acidólise original, com obtenção de dois tipos de lenhina: **LD_{SEA}** correspondente à lenhina isolada do material SEA e **LD_{CEA}** referente à lenhina extraída a partir do material CEA.

Nesta parte será também discutido o efeito de dois tipos de purificação na estrutura na lenhina purificada: Método 1 (**P1**): Dissolução da lenhina em 1,2-dicloroetano/etanol, seguida de precipitação em éter etílico e Método 2 (**P2**): Dissolução da lenhina em dioxano/metanol, seguida de precipitação em água.

Em ambas as partes as lenhinas serão designadas por **LD_x**+ Iniciais das Partes Morfológicas (por exemplo, **LD_{NP}** – Lenhina Dioxano das **N**ervuras/**P**ecíolos; **LD_L** - Lenhina Dioxano dos **L**imbos; **LD_{TF}** - Lenhina Dioxano do **T**alo **F**loral; **LD_{BF}** - Lenhina Dioxano das **B**ainhas **F**oliares e **LD_R** - Lenhina Dioxano do **R**áquis), em que **x** corresponde às iniciais ne/e e SEA/CEA, consoante o método de isolamento e purificação utilizados.

4.4.3.1. Lenhinas Dioxano – Parte I

Tal como referido anteriormente, as lenhinas dioxano analisadas na Parte I foram obtidas a partir do material CEA e isoladas pelo método de acidólise modificado, como descrito nos Materiais e Métodos (Secção 3.6.1.3).

A análise preliminar das lenhinas por espectroscopia de FTIR revelou que as lenhinas isoladas se encontravam contaminadas, dada a obtenção de espectros pouco definidos nomeadamente na região entre os 3800-2500 cm^{-1} e de bandas não características da lenhina como é o caso da banda a 1595 cm^{-1} , indicativa da presença de compostos fenólicos co-extraídos com a lenhina, como sugerido na Secção 4.1.1. A título de exemplo apresenta-se o espectro de FTIR da lenhina não purificada das bainhas foliares (Figura 4.33).

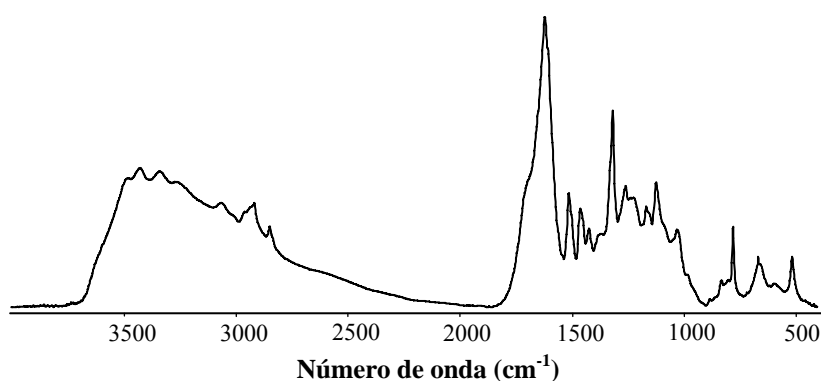


Figura 4.33. Espectro de FTIR da lenhina dioxano das bainhas foliares **LD_{BF}** não purificada.

De forma a obter uma lenhina mais pura, esta foi dissolvida em dioxano:metanol (9/1, v/v) e, de seguida, precipitada em água. Após este processo, o espectro obtido apresentou-se semelhante aos espectros típicos de lenhinas (Figura 4.34). Além da contaminação por parte de compostos fenólicos, como é o caso de taninos, a melhoria da resolução dos espectros de FTIR poderá dever-se à redução significativa no teor em cinzas, passando a apresentar *ca.* 1% das mesmas, em contraste com os 10-40% das lenhinas não purificadas.

Na Tabela 4.25, apresentam-se os rendimentos da lenhina isolada para cada parte morfológica.

Tabela 4.25. Rendimentos de extracção das lenhinas dioxano.

	Rendimento ¹ , %				
	LD _{NP}	LD _L	LD _{TF}	LD _{BF}	LD _R
Lenhina isolada	36,5	37,8	37,0	31,5	33,1
Lenhina purificada ²	23,6	14,0	26,8	28,2	28,3
Lenhina purificada e extraída com CHCl ₃	13,7	14,6	22,3	17,5	19,8

¹%, relativamente à lenhina de Klason determinada no material CEA

² Purificação efectuada por dissolução em dioxano/metanol seguida de precipitação em água.

Os rendimentos devido ao isolamento das lenhinas são relativamente baixos (31-38%) quando comparados com os resultados obtidos por outras plantas anuais [262,263]. Este baixo rendimento poderá ser explicado pela não solubilização da lenhina na mistura reaccional devido à presença de outros compostos, tais como compostos alifáticos, que poderão causar dificuldades de impregnação do solvente no material de partida. As análises de FTIR e RMN CP/MAS de ¹³C das lenhinas isoladas e purificadas evidenciaram que juntamente com a lenhina foi extraída uma fracção de compostos alifáticos (Figuras 4.34 e 4.35), não tendo sido o procedimento de purificação com dioxano/metanol eficaz na extracção da componente alifática. De forma a eliminar os compostos alifáticos adsorvidos nas lenhinas isoladas e purificadas, foi introduzido um passo de extracção com clorofórmio [165], o qual permitiu a obtenção de uma lenhina menos contaminada. As lenhinas antes e após a extracção com clorofórmio foram designadas por **LD_{ne}** e **LD_e**, respectivamente.

É de referir que após os processos de purificação e extracção com clorofórmio da lenhina isolada houve um decréscimo significativo do rendimento (40 a 62%), o qual para além de estar associado a perdas, indica que foram extraídos compostos em quantidades apreciáveis.

Antes do estudo estrutural das várias lenhinas e de forma a verificar qual o efeito da extracção com clorofórmio, compararam-se as lenhinas das bainhas foliares antes (**LD_{ne_BF}**) e após a extracção com clorofórmio (**LD_{e_BF}**).

Efeito da extracção com clorofórmio

Os resultados obtidos por análise elementar e pela determinação dos grupos metoxilo, permite o cálculo da massa molecular média da unidade de fenilpropano (ufp) da lenhina, que pode ser representada através da fórmula empírica $C_9 (C_9H_xO_y(OCH_3)_z)$. Na Tabela 4.26 é apresentada a composição em carbono, hidrogénio e oxigénio das lenhinas **LD_{ne_BF}** e **LD_{e_BF}**, assim como a percentagem de grupos metoxilo.

Tabela 4.26. Análise elementar, percentagem de metoxilos e fórmulas empíricas das ufp da lenhina das bainhas foliares antes (**LD_{ne_BF}**) e após (**LD_{e_BF}**) extracção com clorofórmio.

Lenhina	C (%)	O (%)	H (%)	OCH ₃ (%)	Fórmula Empírica por C ₉	M _{ufp}
LD _{ne_BF}	65,1	28,3	6,6	18,3	-	-
LD _{e_BF}	61,9	33,6	6,7	17,4	C ₉ H _{9,78} O _{2,71} (OCH ₃) _{1,09}	194,9

A lenhina dioxano das bainhas foliares purificada (**LD_{ne_BF}**) apesar de apresentar um baixo teor de polissacarídeos (<1%), apresentou por análise elementar uma percentagem relativamente elevada de carbono (Tabela 4.26). Estes valores podem ser explicados atendendo à intensidade significativa das bandas a 2938 e 2850 cm⁻¹ no espectro de FTIR da **LD_{ne_BF}** (Figura 4.34), correspondentes ao estiramento C-H alifático [268,269], indicativa de que a lenhina se encontra contaminada por uma quantidade significativa de substâncias alifáticas. Esta contaminação é confirmada pelo espectro de RMN de ¹³C de estado sólido (Figura 4.35), pela presença dos sinais a 10-35 ppm atribuídos às ressonâncias de C-H e CH₂ em cadeias alifáticas [183,190]. Devido à elevada contaminação da lenhina **LD_{ne_BF}** por parte de compostos alifáticos, que contribuem para um acréscimo nos valores da análise elementar, a fórmula empírica da unidade fenilpropano foi apenas calculada para a **LD_{e_BF}** (Tabela 4.26).

Após a extracção com clorofórmio da lenhina **LD_{ne_BF}** uma fracção significativa de compostos alifáticos foi extraída, como se pode confirmar pelo decréscimo dos sinais a 2938 e 2850 cm⁻¹ (Figura 4.34) e a 10-35 ppm (Figura 4.35) nos espectros de lenhina **LD_{e_BF}**. Contudo, uma pequena fracção de compostos alifáticos parece ter permanecido na lenhina **LD_{e_BF}** (Figura 4.35). Dado que estes compostos alifáticos não foram removidos após a extracção exaustiva com solventes orgânicos e em meio alcalino aquando do isolamento e purificação, é de prever que estejam quimicamente ligados à lenhina.

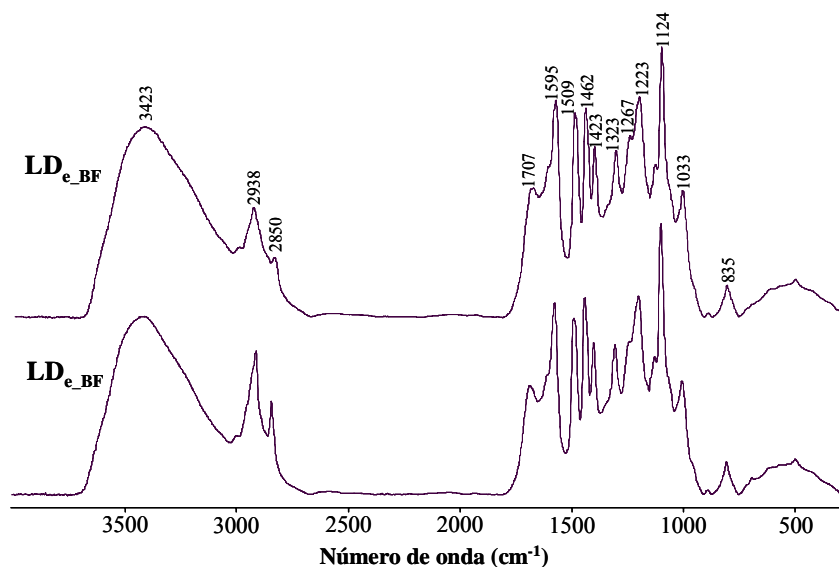


Figura 4.34. Espectros de FTIR das lenhinas dioxano LD_{ne_BF} e LD_{e_BF}.

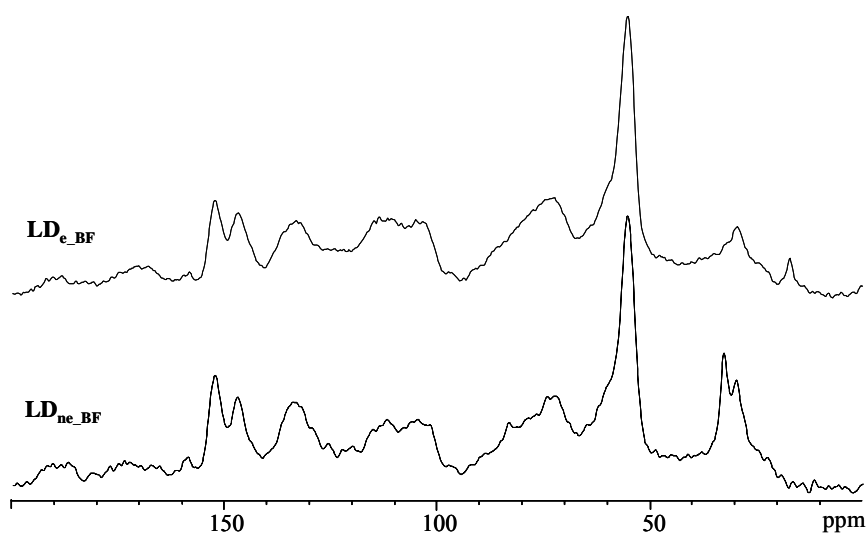


Figura 4.35. Espectros de RMN CP/MAS de ^{13}C das lenhinas dioxano LD_{ne_BF} e LD_{e_BF}.

Apesar da remoção parcial dos compostos alifáticos da **LD_{ne_BF}** ser confirmada pelos espectros de FTIR (Figura 4.34) e de RMN de ^{13}C de estado sólido (Figura 4.35), a extracção com clorofórmio causou um fraccionamento parcial da **LD_{ne_BF}**. Este facto é comprovado pelo decréscimo da intensidade do sinal a 1323 cm^{-1} , observado no espectro de FTIR, atribuído ao estiramento $\text{C}_{\text{Ar}}\text{-OCH}_3$ do anel aromático de unidades seringilo [269] e pela diminuição da razão A_{1462}/A_{1595} , relacionada com o teor de grupos metoxilo na lenhina [270]. Estes decréscimos sugerem que durante o processo de extracção com

clorofórmio uma fracção de lenhina rica em unidades S foi removida juntamente com os compostos alifáticos. A análise do respectivo espectro de RMN CP/MAS de ^{13}C (Figura 4.35) confirma estes resultados através do decréscimo da ressonância a 152 ppm correspondente às ressonâncias C-3/C-5 nas unidades S [186]. A diminuição de unidades S na **LD_e_{BF}** explica o menor teor em grupos metoxilo nesta lenhina quando comparada com a **LD_{ne}_{BF}** (Tabela 4.26). Contrariamente às unidades S, a proporção de unidades guaiacilo aumentou ligeiramente, como pode ser observado através da maior intensidade do grupo de sinais a 110-120 ppm, atribuídos às ressonâncias C-2/C-5/C-6 deste tipo de unidades [186]. A diminuição do sinal a 159 ppm presente na **LD_{ne}_{BF}**, correspondente à ressonância C-4 em estruturas do tipo H após a respectiva extracção, indica que uma fracção destas estruturas é também removida.

Pela análise destes resultados, é possível então concluir que a **LD_e_{BF}** é uma lenhina do tipo HGS, na qual uma fracção de lenhina rica em unidades H e S encontra-se fortemente associada, a nível estrutural, a compostos alifáticos. A natureza destas estruturas alifáticas foi estudada através da análise por GC-MS do extracto em clorofórmio saponificado, o qual será discutido com maior detalhe mais à frente.

A análise dos espectros de UV de lenhinas (Figura 4.36) permite obter informação estrutural adicional. As bandas de absorção no espectro de UV das lenhinas das bainhas foliares são idênticas às apresentadas por outras lenhinas dioxano de plantas anuais [262,263]. Comparando as lenhinas, verifica-se que o valor de absorptividade correspondente ao máximo de absorção característico da transição $\pi \rightarrow \pi^*$ no anel aromático, a 280 nm, é superior na **LD_{ne}_{BF}**. Este facto pode ser explicado pela presença dos contaminantes de natureza alifática na **LD_{ne}_{BF}**, discutidos anteriormente. A absorção a cerca de 310 nm indica por outro lado a presença de estruturas contendo ligações insaturadas conjugadas com o anel aromático, sendo esta banda em geral indicativa da presença de estruturas do tipo ácido hidroxicinâmico [212]. A presença deste tipo de estruturas é corroborada pelos espectros de FTIR (Figura 4.34), através da presença das bandas a 1705 e 1630 cm^{-1} , atribuídas ao estiramento C=O dos ácidos carboxílicos, e ao estiramento C=C conjugado com o anel aromático, respectivamente [269].

Tal como sucede com a banda a 280 nm, a absorptividade a 310 nm na **LD_e_{BF}** é inferior à **LD_{ne}_{BF}**, o que sugere que durante a extracção com clorofórmio deverá ter sido

removida, juntamente com os compostos alifáticos, uma fracção de estruturas do tipo ácido hidróxicinâmico.

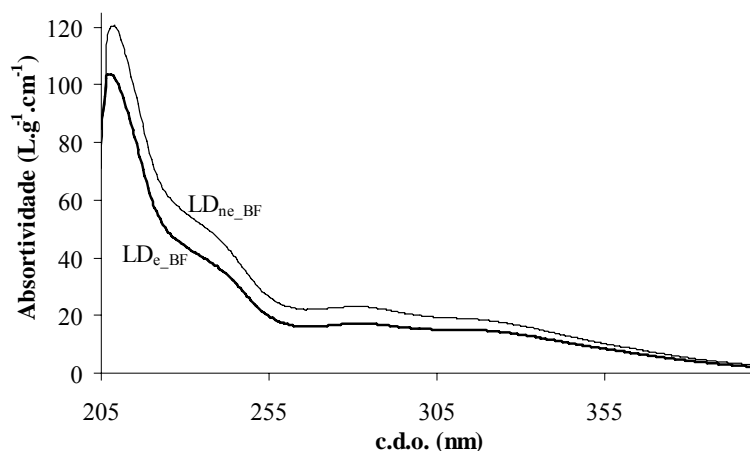


Figura 4.36. Espectros de UV-Visível das lenhinas dioxano LD_{ne_BF} e LD_{e_BF} .

Relativamente à análise das lenhinas por GPC, a LD_{ne_BF} e a LD_{e_BF} apresentam uma curva de distribuição de pesos moleculares bimodal para ambas as amostras (Figura 4.37).

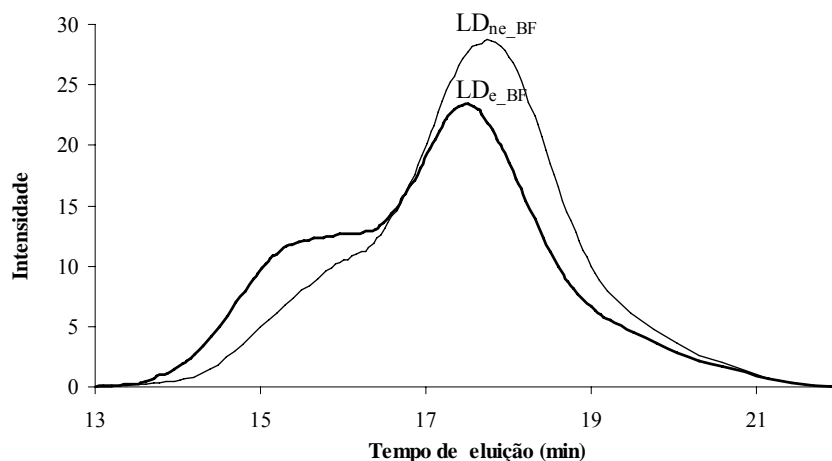


Figura 4.37. Cromatogramas de permeação em gel das lenhinas dioxano LD_{ne_BF} e LD_{e_BF} .

A presença do ombro a 13-16 min pode ser explicada pela presença de uma fracção de lenhina quimicamente ligada a compostos alifáticos que afectam o volume hidrodinâmico das macromoléculas de lenhina. O aumento da proporção desta fracção, após a extracção com clorofórmio LD_{e_BF} , é atribuída à remoção de uma fracção de lenhina de baixo peso molecular e de compostos alifáticos livres durante a extracção com

clorofórmio. Este facto explica o valor superior de 3325 Da de \overline{M}_w obtido para a **LD_e_{BF}**, em comparação com o valor de 2350 Da apresentado pela **LD_{ne}_{BF}**.

Relativamente à análise dos produtos da oxidação com permanganato (Tabela 4.27), tal como verificado nas espectroscopias de FTIR e RMN CP/MAS de ^{13}C , confirma-se que durante o processo de extracção com clorofórmio, uma fracção de unidades H e S foram extraídas. O ligeiro decréscimo verificado no teor deste tipo de unidades, aliado ao aumento no grau de condensação da **LD_e_{BF}**, confirma que uma fracção de lenhina de baixo peso molecular é removida durante a extracção com clorofórmio.

Contudo, pelas proporções HGS obtidas (Tabela 4.27) verifica-se que a variação obtida entre a **LD_{ne}_{BF}** e **LD_e_{BF}** não é significativa.

Tabela 4.27. Resultados da oxidação com permanganato das lenhinas dioxano das bainhas foliares antes e após extracção com clorofórmio (Figura 4.29).

Lenhina	Abundância Relativa, mol%									$\eta\%^1$	H:G:S	nC:C
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX			
LD _{BFne}	22	32	27	5	3	2	5	1	3	16,8	22:48:30	81:19
LD _{BF_e}	21	33	24	6	3	2	6	1	4	14,1	21:51:28	78:22

¹ %(m/m), relativamente à percentagem de lenhina analisada

Deste modo, pela análise global dos resultados, pode concluir-se que a extracção com clorofórmio origina uma lenhina menos contaminada, sem alterações estruturais significativas.

Atendendo a estes resultados, as lenhinas das restantes partes morfológicas foram submetidas de igual modo a uma extracção com clorofórmio e caracterizadas exaustivamente para elucidação estrutural.

No entanto, antes de proceder à discussão dos resultados da caracterização das lenhinas propriamente ditas e, com o objectivo de elucidar a natureza da fracção extraída com clorofórmio, efectuou-se a sua caracterização por GC-MS, que é discutida de seguida.

Caracterização estrutural dos extractos em clorofórmio

Dada a elevada probabilidade da fracção alifática extraída com clorofórmio se encontrar quimicamente ligada à lenhina, optou-se por efectuar a hidrólise alcalina dos extractos (secção 3.4.2), de forma a ser possível analisar por GC-MS a fracção de compostos que se encontra na forma esterificada (secção 3.4.3). A título de exemplo na Figura 4.38 é apresentado o cromatograma referente ao extracto em clorofórmio das bainhas foliares. A identificação e quantificação dos compostos das diferentes partes morfológicas encontram-se na Tabela 4.28.

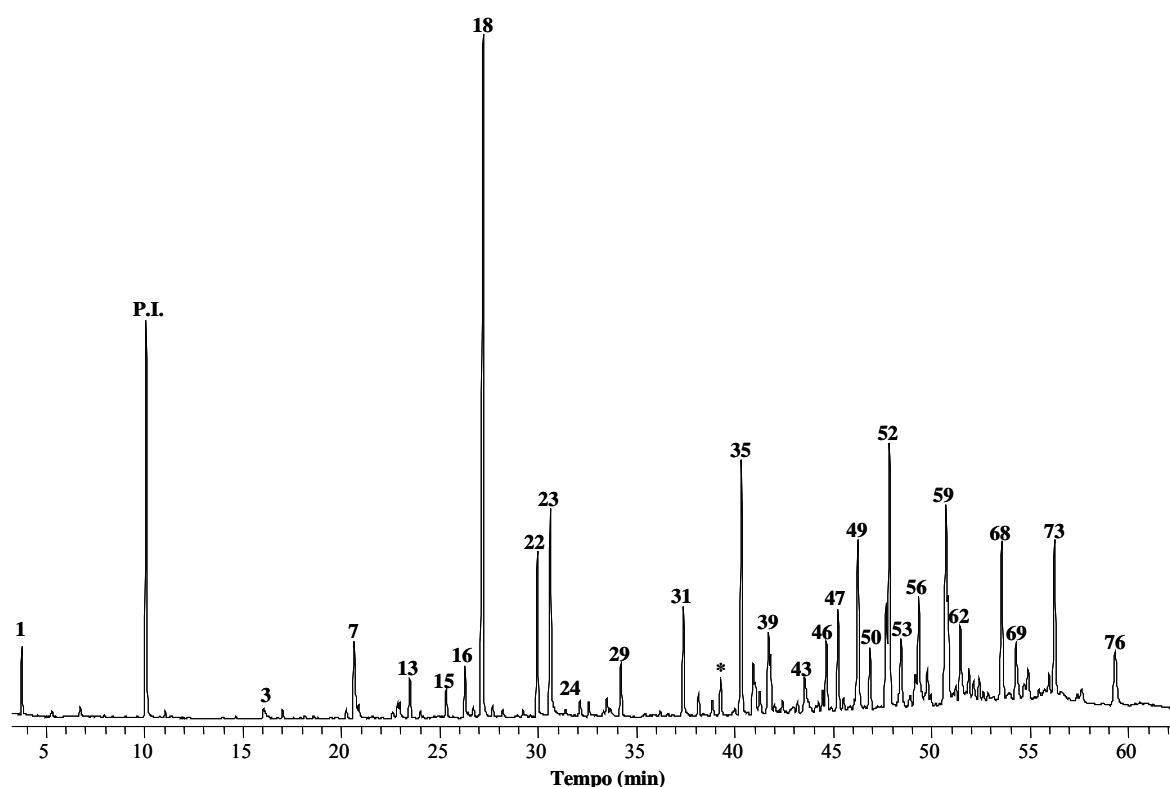


Figura 4.38. Cromatograma do extracto em clorofórmio hidrolisado da lenhina dioxano LD_{ne}_BF (*contaminante).

Tabela 4.28. Compostos (mg de composto/g de extracto) identificados nos extractos em clorofórmio das lenhinas dioxano LD_{ne} das diferentes partes morfológicas da ‘Dwarf Cavendish’.

Pico no.	Composto	Nervuras/ Pecíolos	Limbos	Talo Floral	Bainhas Foliares	Ráquis
1	1-Octanol	0,1	0,7	0,4	0,9	0,2
2	Ácido 3-hidroxiocetanóico	n.d.	n.d.	0,3	n.d.	n.d.
3	3-Metóxi-4-hidroxibenzaldeído	0,9	0,1	0,9	0,3	0,6
5	1-Dodecanol	<0,05	0,3	0,7	0,1	0,4
6	Ácido dodecanóico	0,1	0,3	0,4	0,2	0,1
7	3,5-Dimetóxi-4-hidroxibenzaldeído	1,3	0,1	0,9	2,1	2,7
9	Ácido octanodióico	n.d.	0,1	<0,05	<0,05	<0,05
12	Ácido 3-metóxi-4-hidroxibenzóico	0,4	0,1	0,6	0,3	0,4
13	Ácido <i>p</i> -cumárico (<i>cis</i>)	0,2	<0,05	1,5	0,9	0,9
14	Ácido nonadióico	0,1	0,4	0,5	0,1	<0,05
15	Ácido tetradecanóico	0,2	0,4	0,9	0,6	0,3
16	Ácido 3,5-dimetóxi-4-hidroxibenzóico	0,5	0,1	0,8	1,0	1,5
17	Ácido ferúlico (<i>cis</i>)	<0,05	<0,05	0,5	0,2	n.d.
18	Ácido <i>p</i> -cumárico (<i>trans</i>)	3,7	0,2	27,5	15,5	10,1
19	Ácido pentadecanóico	0,1	0,5	0,6	0,2	0,2
20	1-Hexadecanol	0,1	0,1	0,3	0,1	0,2
21	Ácido 9-hexadecenóico	0,1	0,1	0,5	0,2	0,4
22	Ácido n-hexadecanóico	2,0	5,3	12,5	3,4	2,4
23	Ácido ferúlico (<i>trans</i>)	3,0	0,5	9,5	4,6	1,2
24	Ácido heptadecanóico	0,2	0,4	0,6	0,4	0,2
25	1-Octadecanol	0,2	0,1	1,2	0,3	0,4
26	Ácido 9,12-octadecadienóico	0,1	n.d.	1,3	0,1	0,1
27	Ácido 9-octadecenóico (<i>cis</i>)	0,2	0,5	2,1	0,4	0,5
28	Ácido 9-octadecenóico (<i>trans</i>)	0,2	0,1	2,2	0,3	0,2
29	Ácido octadecanóico	0,5	1,6	3,3	1,2	0,9
30	Ácido nonadecanóico	0,1	<0,05	0,2	0,1	0,1
31	Ácido 16-hidroxi-hexadecanóico	0,9	4,0	1,3	2,4	0,4
32	Ácido eicosanóico	0,2	0,5	1,6	0,5	0,2
33	Ácido 12-hidroxi-octadecanóico	0,2	<0,05	<0,05	<0,05	0,1
34	Ácido hexadecanodióico	<0,05	<0,05	0,4	0,3	0,1
35	Ácido 18-hidroxi-octadecenóico	1,7	4,6	4,8	5,9	1,5
36	Ácido 10,16-di-hidroxi-hexadecanóico	2,9	17,7	1,2	1,2	1,5
37	Ácido 18-hidroxi-octadecanóico	0,5	17,7	1,2	0,7	0,2
38	Ácido 2-hidroxi-eicosanóico	0,2	0,3	2,5	0,6	0,5
40	Ácido docosanóico	0,5	1,4	5,1	1,1	0,4
41	Ácido octadecanodióico	<0,05	<0,05	0,5	0,2	n.d.
43	Ácido tricosanóico	0,9	<0,05	3,2	0,8	0,4
44	Ácido di-hidroxi-octadecanóico	0,4	2,2	<0,05	<0,05	0,6
45	Ácido 20-hidroxicosanóico	0,2	0,5	1,0	0,4	<0,05
46	Ácido 2-hidroxidocosanóico	0,8	1,3	4,6	1,6	0,7
47	Ácido tetracosanóico	0,9	2,6	8,6	2,4	1,1
49	Ácido 9,18,19-tri-hidroxi-octadecanóico	6,7	27,4	12,7	4,2	9,8
51	Ácido 22-hidroxidocosanóico	1,1	5,1	10,4	2,6	0,4

Tabela 4.28. Compostos (mg de composto/g de extracto) identificados nos extractos em clorofórmio das lenhinas dioxano LD_{ne} das diferentes partes morfológicas da ‘Dwarf Cavendish’ (continuação).

Pico no.	Composto	Nervuras/ Pecíolos	Limbos	Talo	Floral	Bainhas Foliares	Ráquis
52	Ácido 2-hidroxitetracosanóico	1,5	3,9	33,9	6,3	2,3	
53	Ácido hexacosanóico	0,6	0,6	3,3	1,7	0,9	
56	Ácido 2-hidroxipentacosanóico	0,6	2,0	15,1	2,7	1,1	
58	Ácido heptacosanóico	n.d.	<0,05	<0,05	0,2	<0,05	
59	Ácido 24-hidroxitetracosanóico	1,3	2,3	19,0	5,5	0,8	
60	Ácido α -hidroxi-n-hexacosanóico	0,4	0,7	21,4	2,0	1,6	
62	Ácido octacosanóico	0,6	0,7	0,9	1,8	0,6	
63	Ácido tetracosanodióico	0,2	<0,05	3,8	0,7	<0,05	
64	Ácido 25-hidroxipentacosanóico	0,1	<0,05	0,6	0,4	<0,05	
65	β -Sitosterol	0,3	0,7	0,7	0,4	0,3	
67	Ácido nonacosanóico	n.d.	<0,05	n.d.	0,1	<0,05	
68	Ácido 26-hidroxi-hexacosanóico	1,4	0,8	9,4	4,4	0,7	
69	Ácido triacontanóico	0,2	1,1	0,7	1,3	0,3	
70	Ácido hexacosanodióico	<0,05	<0,05	1,6	0,4	<0,05	
71	Ácido 27-hidroxi-heptacosanóico	0,2	0,1	0,8	0,9	0,2	
73	Ácido 28-hidroxi-octacosanóico	0,6	0,2	1,6	4,0	0,2	
74	Ácido octacosanodióico	n.d	n.d	<0,05	0,2	n.d.	
75	Ácido 29-hidroxinonacosanóico	0,2	<0,05	<0,05	0,4	n.d.	
76	Ácido 30-hidroxicontanóico	0,1	<0,05	<0,05	2,2	<0,05	
Total (Compostos identificados)		42,5	116,1	252,9	99,2	55,7	
Total (Compostos não identificados)		3,0	3,4	4,5	2,8	4,3	
Total		45,5	119,5	257,4	102,0	60,0	

n.d.- não detectado

De entre os compostos identificados destacam-se os pertencentes à família dos ácidos gordos (saturados, insaturados, hidroxíácidos, ácidos dicarboxílicos), a qual constitui a fracção maioritária. Ácidos hidroxicinâmicos, nomeadamente os ácidos *p*-cumárico e ferúlico e compostos aromáticos derivados da lenhina foram também identificados (Tabela 4.28).

De entre os ácidos gordos destacam-se os ácidos hexadecanóico **22**, o 10,16-di-hidroxi-hexadecanóico **36**, o 18-hidroxi-octadecanóico **35**, o 9,18,19-tri-hidroxi-octadecanóico **49**, o 22-hidroxidocosanóico **51**, o 2-hidroxitetraacosanóico **52**, o 24-hidroxitetraacosanóico **59** e o 26-hidroxi-hexacosanóico **68**. Estes α e ω -hidroxíácidos, juntamente com os ácidos *p*-cumárico e ferúlico, podem derivar de estruturas do tipo cutina/suberina, as quais poderão ter sido saponificadas durante o passo da pré-extracção alcalina do material extraído que antecedeu o isolamento da lenhina. Uma vez que é conhecida a existência de suberina quimicamente ligada à lenhina presente na parede celular primária em certos tecidos de plantas anuais [78,85,271], os resíduos de ácidos *p*-

cumárico e ferúlico esterificados deverão ser constituintes da cutina e/ou suberina presente nos tecidos cutinizados e/ou suberizados na ‘Dwarf Cavendish’.

Embora a presença de ácido 3-metóxi-4-hidroxibenzóico (ácido vanílico) **12** no extracto em clorofórmio indique a extracção de uma pequena fracção de unidades G das lenhinas LD_{ne}, os compostos derivados das unidades S, nomeadamente o 3,5-dimetóxi-4-hidroxibenzaldeído (seringaldeído) **7** e o ácido 3,5-dimetóxi-4-hidroxibenzóico (ácido sirínico) **16**, são extraídos em maior quantidade. Esta observação vai ao encontro do decréscimo verificado no teor de unidades S na LD_{e_BF}. O decréscimo verificado nas unidades H na LD_{e_BF} poderá dever-se em parte à remoção do ácido *p*-cumárico que, no caso da oxidação com permanganato, contribui para a quantificação das unidades H.

O facto de apenas 5-26% do extracto em clorofórmio ter sido analisado, parece indicar que este deverá ser constituído maioritariamente por compostos tipo cutina e/ou suberina e lenhina de elevado peso molecular, não hidrolizáveis e logo não detectáveis por GC-MS. De forma a analisar a fracção aromática extraída, submeteram-se os vários extractos alcalinos a oxidação com permanganato, cujos resultados se encontram na Tabela 4.29.

Tabela 4.29. Resultados da oxidação com permanganato dos extractos em clorofórmio das lenhinas LD_{ne} (ver Figura 4.29).

Produto	Abundância Relativa, %mol				
	Nervuras/Pecíolos	Limbos	Talo Floral	Bainhas Foliares	Ráquis
I	6	6	35	18	18
II	46	53	33	27	25
III	30	20	18	38	43
IV	3	6	4	3	2
V	4	3	2	2	2
VI	2	1	1	3	2
VII	3	4	4	4	2
VIII	2	2	1	1	1
IX	4	4	1	4	5
X	<0,5	1	1	<0,5	<0,5
H:G:S	6:60:34	6:71:23	36:45:20	18:39:43	18:34:48
nC:C	82:18	79:21	86:14	83:17	86:14
η %	15,3%	3,8	14,7	10,5	11,2

Analisando os resultados obtidos verifica-se que o rendimento para o extracto dos limbos é muito inferior aos restantes. Este facto poderá dever-se não só à presença de uma fracção de lenhina com poucos grupos hidroxilo livres, mas principalmente ao facto de ser constituído essencialmente por compostos alifáticos.

O elevado teor de unidades H obtido para o talo floral, seguido das bainhas foliares e ráquis (Tabela 4.29), está de acordo com o elevado teor de ácido *p*-cumárico presente no extracto destas partes morfológicas e determinado por GC-MS (Tabela 4.28). O mesmo sucede com as unidades S, as quais são mais abundantes no extracto das bainhas foliares e do ráquis.

A presença dos compostos **IV-X** revela que uma fracção de estruturas condensadas é também extraída com clorofórmio, nomeadamente os compostos diarílicos **VIII** e **IX** e bifenilo **VII**. É de realçar a detecção do composto **X** (Figura 4.39), o qual evidencia o envolvimento das unidades H na condensação da lenhina, em particular na lenhina dos limbos e do talo floral.

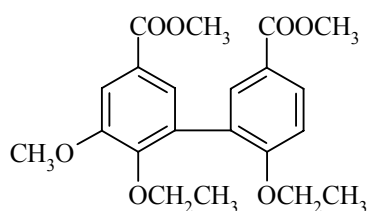


Figura 4.39. Estrutura do composto **X**.

A análise dos extractos em clorofórmio por GPC confirma que durante este processo foram removidos compostos de baixo peso molecular (1000-1600 Da) (Tabela 4.30).

Tabela 4.30. Peso molecular médio ponderado (\overline{M}_w) dos extractos em clorofórmio das lenhinas LD_{ne}.

Amostra	\overline{M}_w (Da)
Nervuras/Pecíolos	1500
Limbos	1250
Talo Floral	1050
Bainhas Foliares	1550
Ráquis	1550

Por análise dos cromatogramas de GPC obtidos (Figura 4.40), verifica-se que contrariamente às restantes partes morfológicas, os extractos dos limbos e do talo floral, apresentam uma distribuição bimodal, o que indica a presença de estruturas com diferentes volumes molares hidrodinâmicos nos respectivos extractos.

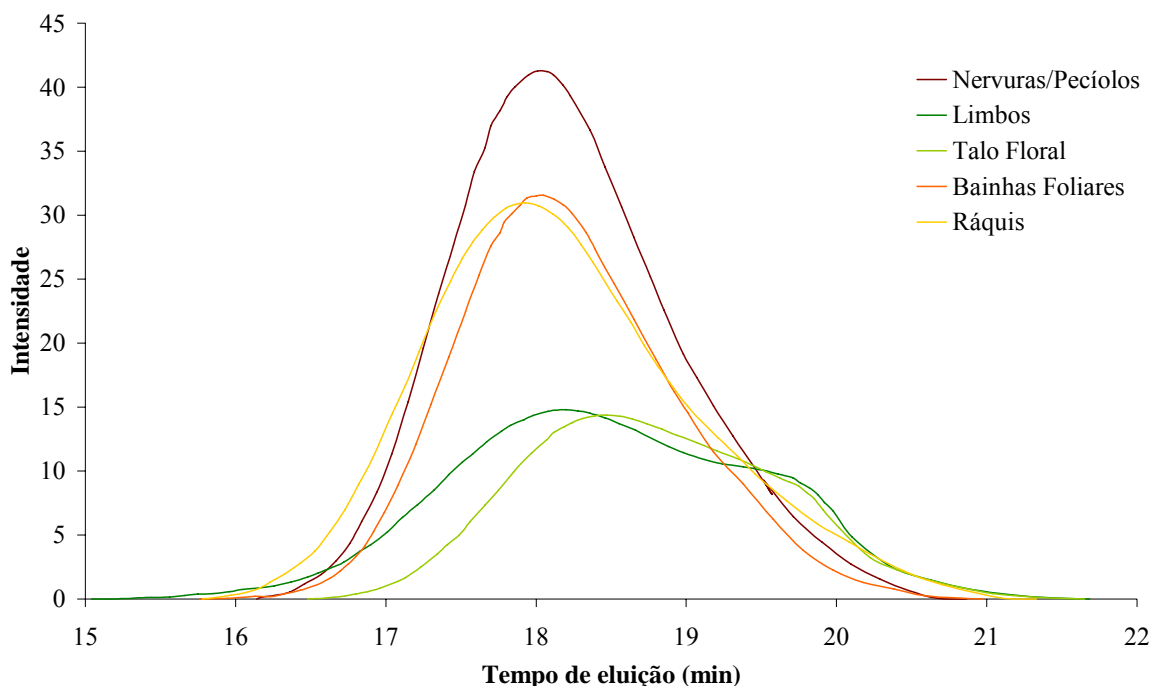


Figura 4.40. Cromatogramas de permeação em gel dos extractos em clorofórmio das lenhinas LD_{ne}.

Caracterização Estrutural das Lenhinas Dioxano LD_e

Tendo em conta as análises e consequentes resultados anteriormente apresentados, as lenhinas extraídas pelo método dioxano com renovação de solvente, purificadas com dioxano/metanol foram extraídas com clorofórmio. De seguida, é apresentada a sua caracterização estrutural exaustiva.

Espectroscopia de FTIR e de RMN CP/MAS de ¹³C

A caracterização por FTIR e por RMN de ¹³C de estado sólido (Figuras 4.41 e 4.42) permitiu tirar algumas conclusões acerca da estrutura das lenhinas das diferentes regiões morfológicas.

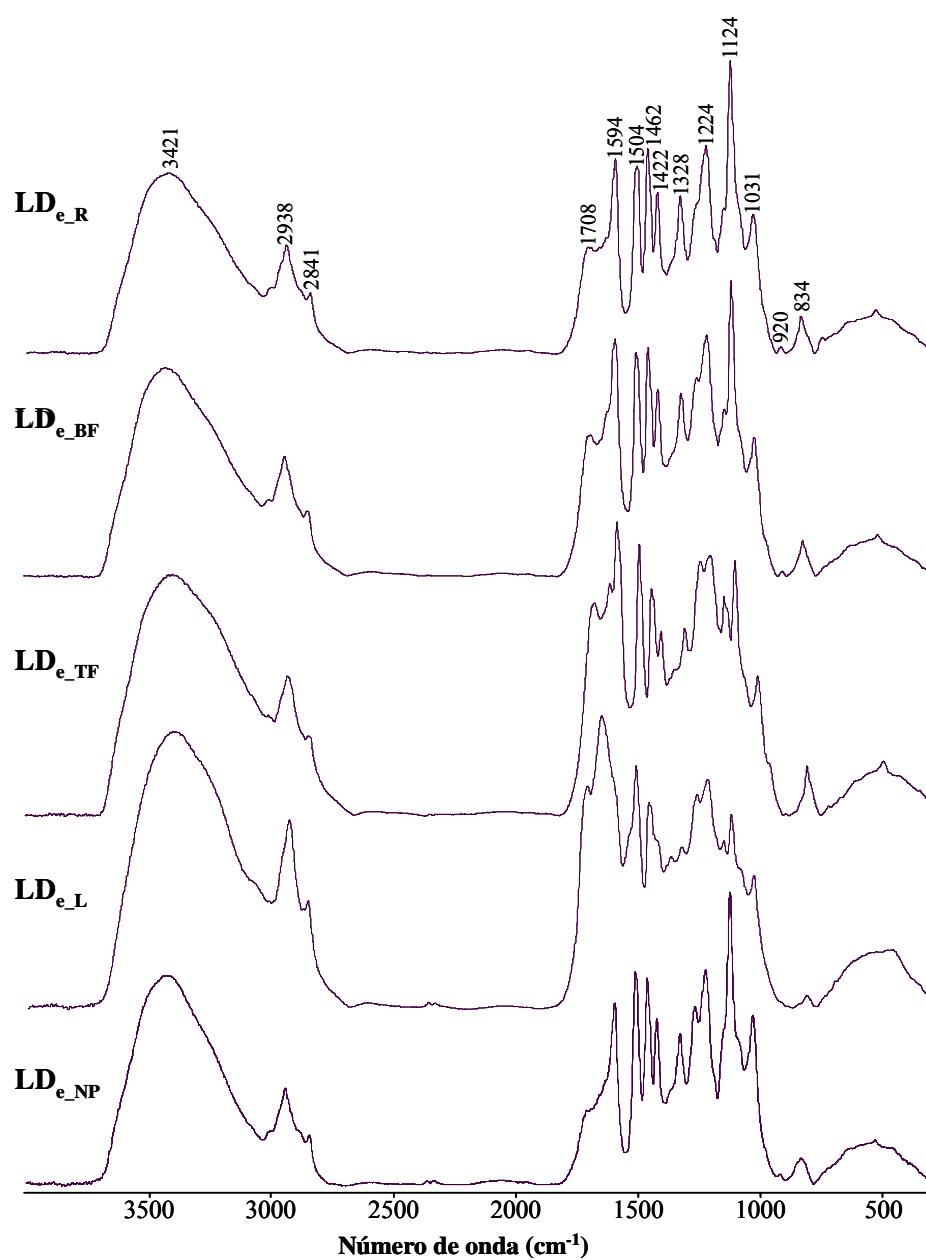


Figura 4.41. Espectros de FTIR das lenhinas dioxano LD_{e} .

Com base nos espectros de FTIR é possível classificar as várias lenhinas como lenhinas HGS, dada a presença das bandas a 1124 e 834 cm^{-1} , atribuídas às vibrações da ligação C-H aromática em unidades do tipo G, S e H, respectivamente.

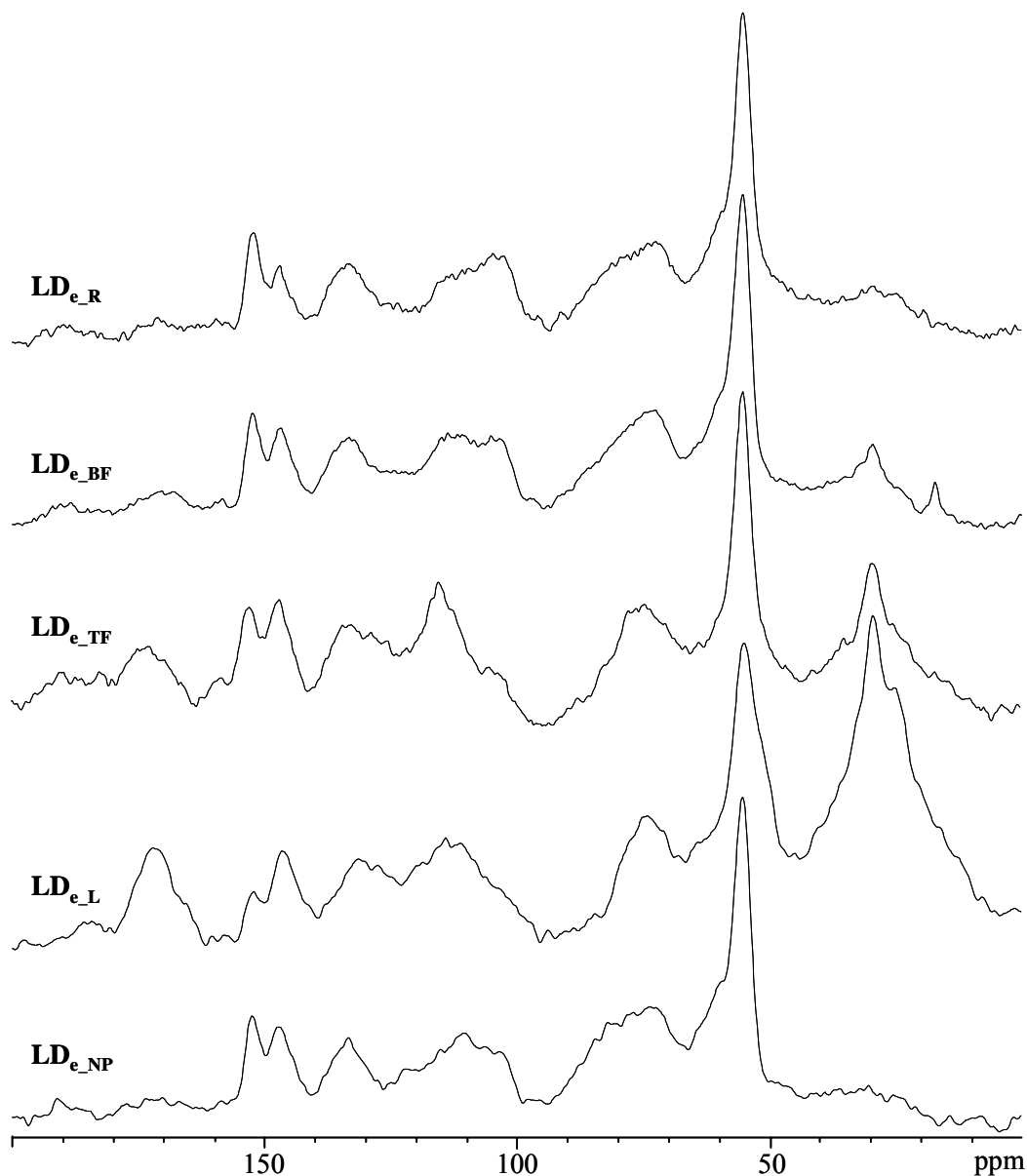


Figura 4.42. Espectros de RMN CP/MAS de ^{13}C das lenhinas dioxano LD_e .

Nos espectros de FTIR a banda a 1708 cm^{-1} , atribuída ao estiramento da ligação $\text{C}=\text{O}$ em grupos éster não conjugados com o anel aromático, em conjunto com o ombro a 1166 cm^{-1} , correspondente ao estiramento da ligação $\text{C}=\text{O}$ em grupos éster conjugados com o anel aromático sugerem a presença de ésteres do ácido *p*-cumárico nomeadamente na lenhina dioxano do talo floral LD_{e_TF} , das bainhas foliares LD_{e_BF} e do ráquis LD_{e_R} (Figura 4.41).

Tal como observado nas lenhinas *in situ*, a quantidade de grupos metoxilo, estimada a partir dos espectros de FTIR pela razão A_{1462}/A_{1594} , revela que as lenhinas LD_{e_NP} , LD_{e_BF}

e **LD_{e_R}** deverão possuir um maior teor de unidades S, ao contrário do que sucede com a **LD_{e_TF}** [272].

Confrontando estes resultados com a razão das intensidades dos sinais a 114 e 152 ppm nos espectros de RMN de ^{13}C , atribuídos às unidades G e S, respectivamente, confirma-se que as lenhinas **LD_{e_NP}**, **LD_{e_BF}** e **LD_{e_R}** são mais ricas em unidades S. No caso da lenhina dos limbos **LD_{e_L}** as unidades G são predominantes. Relativamente às unidades H, os espectros apresentados pelas duas técnicas espectroscópicas revelam que, são mais abundantes na **LD_{e_TF}** (834 cm^{-1} e 159 ppm), o que justifica o seu menor teor em grupos metoxilo.

Em ambos os espectros de FTIR e RMN é possível ainda verificar a existência de compostos alifáticos nas lenhinas, em particular na dos limbos. A presença destes sinais após os vários processos de purificação, evidencia a existência de ligações químicas entre a lenhina e compostos alifáticos do tipo cutina e/ou suberina.

Comparativamente às lenhinas das restantes fracções, o espectro de FTIR da lenhina **LD_{e_L}** apresenta dois picos muito intensos a 2938 e 2841 cm^{-1} e uma banda proeminente a cerca dos 1656 cm^{-1} , que indica a presença de estruturas com grupos cetónicos conjugados com anéis aromáticos *p*-dissubstituídos, em que na posição β existe um carbono ligado a um oxigénio [273,274]. Esta observação é confirmada pelo respectivo espectro de RMN de ^{13}C (Figura 4.42), no qual são também visíveis os sinais alifáticos na região 24-54 ppm e o sinal a 160-180 ppm, atribuído aos grupos éster nos componentes alifáticos.

Um outro parâmetro que pode ser analisado através dos espectros de FTIR, é o grau de condensação das lenhinas que, segundo Faix [275], é proporcional ao valor obtido a partir da razão entre sete mínimos (1550, 1484, 1440, 1395, 1300, 1177 e 1070 cm^{-1}) e seis máximos (1510, 1463, 1425, 1329, 1224 e 1140 ou 1125 cm^{-1}). De entre as lenhinas em análise, a **LD_{e_L}** apresenta um maior grau de condensação (0,94) seguida da **LD_{e_TF}** (0,79), **LD_{e_R}** (0,65), **LD_{e_BF}** (0,61) e por fim, da **LD_{e_NP}** (0,59).

Espectroscopia de Ultravioleta/Visível

Os espectros de UV das lenhinas das várias fracções em estudo (Figura 4.42) são semelhantes aos apresentados por outras plantas anuais [262,263]. Os valores de absorptividade específica nos comprimentos de onda de máxima absorvância são apresentados na Tabela 4.31.

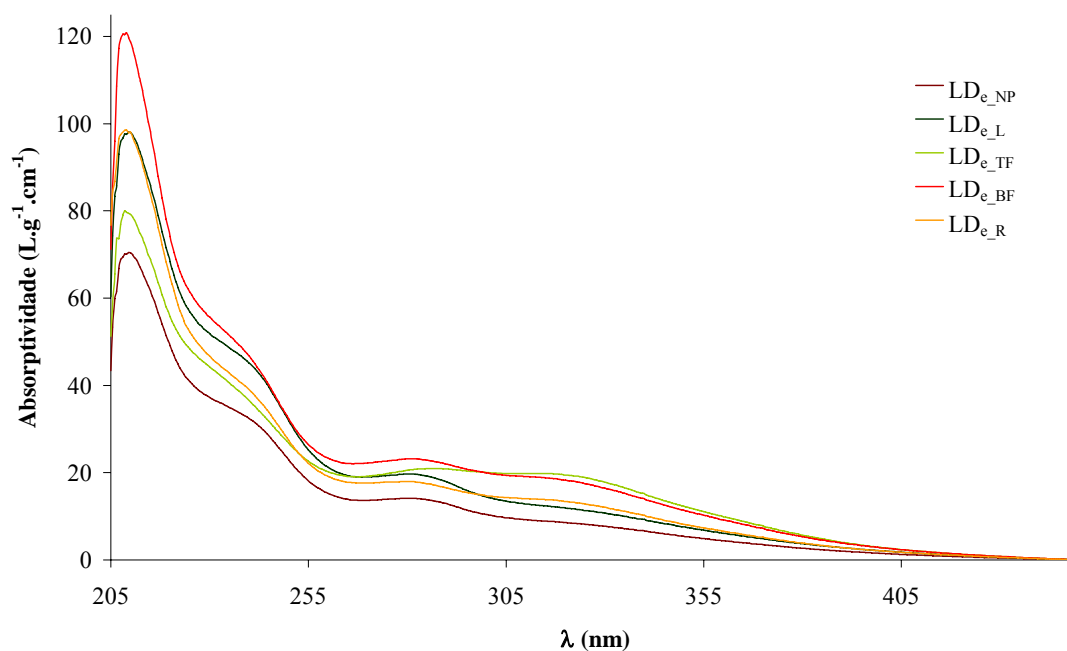


Figura 4.43. Espectros de UV-Visível das lenhinas dioxano **LD_e**.

No caso da **LD_e_TF** o máximo de absorção, devido à presença de grupos hidroxilo livres ou eterificados no anel aromático, ocorre a 287 nm, valor superior ao registado para as restantes lenhinas (280-282 nm). Dado que as unidades S provocam um desvio hipsocrómico e um efeito hipocrómico em relação às unidades G, conclui-se que a **LD_e_TF** é menos rica em unidades S do que as restantes amostras.

Paralelamente a esta observação, o valor elevado obtido para a absorptividade específica a 310 nm, normalmente indicativa da presença de estruturas do tipo ácido hidroxycinâmico, mostra que a **LD_e_TF** apresenta um teor superior deste tipo de estruturas quando comparado com as restantes lenhinas. Estes resultados são concordantes com os obtidos por FTIR e RMN de ¹³C de estado sólido (Figuras 4.41 e 4.42).

Tabela 4.31. Absortividade específica (ε) das lenhinas dioxano **LD_e**.

Amostras	ε_{310} (L.g ⁻¹ .cm ⁻¹)	$\varepsilon_{\lambda_{\text{máx}}}$ (L.g ⁻¹ .cm ⁻¹)	$\lambda_{\text{máx}}$
LD _{e_NP}	9,2	14,2	281
LD _{e_L}	12,8	19,7	281
LD _{e_TF}	19,8	20,4	287
LD _{e_BF}	15,1	23,2	282
LD _{e_R}	14,0	17,9	280

Fórmula Empírica

Na Tabela 4.32 apresentam-se os valores de análise elementar, percentagem de grupos metoxilo e as fórmulas empíricas das unidades fenilpropano das lenhinas dioxano das várias partes morfológicas da ‘Dwarf Cavendish’.

Tabela 4.32. Análise elementar, percentagem de grupos metoxilo e fórmulas empíricas das ufp das lenhinas dioxano **LD_e** da ‘Dwarf Cavendish’.

Análise Elementar (%m/m) ¹						
Lenhina	C	H	O	%OCH ₃	Fórmula Empírica	M _{ufp}
LD _{e_NP}	56,0	5,7	38,3	18,3	C ₉ H _{8,57} O _{3,98} (OCH ₃) _{1,30}	220,6
LD _{e_L} ²	60,0	7,0	33,0	9,4	—	—
LD _{e_TF}	56,7	5,4	37,9	9,9	C ₉ H _{9,15} O _{4,19} (OCH ₃) _{0,66}	204,5
LD _{e_BF}	61,9	6,7	33,6	17,4	C ₉ H _{9,78} O _{2,71} (OCH ₃) _{1,09}	194,9
LD _{e_R}	55,0	5,6	39,4	19,3	C ₉ H _{8,54} O _{4,18} (OCH ₃) _{1,41}	185,5

¹ Valores corrigidos para o teor em monossacarídeos e cinzas

² Dada a elevada contaminação por parte de compostos alifáticos não foi determinada a fórmula empírica

De uma maneira geral a análise elementar das lenhinas em estudo revelam teores de carbono e hidrogénio da mesma ordem de grandeza que os indicados na literatura para outras espécies anuais [262,263].

Relativamente às fórmulas empíricas, as lenhinas apresentam diferenças entre si na proporção de hidrogénio e oxigénio, destacando-se a proporção elevada em oxigénio das lenhinas **LD_{e_NP}**, **LD_{e_TF}** e **LD_{e_R}**.

A análise do teor em grupos metoxilo permite mais uma vez confirmar que as lenhinas **LD_{e_NP}** e **LD_{e_R}** são mais ricas em unidades S, enquanto que a lenhina **LD_{e_TF}** é a que apresenta um teor mais baixo neste tipo de unidades.

Sendo conhecidas as inter-ligações existentes entre a lenhina e os hidratos de carbono [102] efectuou-se a determinação dos monossacarídeos nas lenhinas em estudo. Pelos resultados apresentados na Tabela 4.33 pode-se concluir que as amostras apresentam baixos teores de hidratos de carbono (*ca.* 1%), sendo a sua influência na análise elementar desprezável (Tabela 4.32). Apesar da sua baixa proporção, a presença de teores superiores de arabinose e xilose, pode ser uma indicação da existência de ligações entre a lenhina e os hidratos de carbono uma vez que estes estão geralmente presentes nos complexos lenhina-hidratos de carbono [107].

Tabela 4.33. Composição média em monossacarídeos (% m/m, na forma anidra) das lenhinas dioxano LD_e.

Lenhina	% (m/m) monossacarídeo							Total
	Ramnose	Fucose	Arabinose	Xilose	Manose	Galactose	Glucose	
LD _e _{NP}	0,1	n.d.	0,2	0,4	<0,05	<0,05	0,2	0,9
LD _e _L	<0,05	0,1	0,3	0,2	<0,05	0,1	0,3	1,0
LD _e _{TF}	0,1	n.d.	0,2	0,2	<0,05	0,1	0,1	0,7
LD _e _{BF}	<0,05	0,1	0,2	0,2	<0,05	<0,05	0,2	0,7
LD _e _R	n.d.	0,1	0,1	0,2	<0,05	<0,05	0,1	0,5

n.d.- não detectado

Oxidação com permanganato

Comparativamente às lenhinas *in situ* (Tabela 4.19), a análise das lenhinas dioxano por oxidação com permanganato revela em geral um aumento no teor de ligações 4-*O*-5 envolvendo unidades do tipo S (composto **IX**, Figura 4.29), uma diminuição do teor de unidades H com grupo hidroxilo fenólico livre (composto **I**) e um aumento significativo do número de unidades S não condensadas com grupo hidroxilo fenólico livre (composto **III**) (Tabela 4.34). Estas alterações estruturais sugerem que durante a extracção da lenhina dioxano, catalisada por ácido clorídrico, ocorre: *i*) uma clivagem significativa de ligações β -*O*-4 envolvendo unidades S e a formação de novas ligações 4-*O*-5 que se reflectem no aumento da proporção dos compostos **III** e **IX** obtidos após oxidação da lenhina com permanganato de potássio; *ii*) reacções de condensação, catalisadas pelo meio ácido, envolvendo os grupos hidroxilo fenólicos livres das unidades G e possivelmente das unidades H, os quais são abundantes neste tipo de unidades na lenhina *in situ* e *iii*)

hidrólise em meio ácido das ligações lábeis de uma fracção das unidades H (estruturas do tipo *p*-hidroxifenilpropano ou cumarato).

Tabela 4.34. Resultados da oxidação com permanganato das lenhinas dioxano **LD_e**.

Lenhina	Abundância Relativa, % molar									$\eta\%$ ¹	H:G:S	nC:C
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX			
LD _{e_NP}	6	48	20	6	5	2	6	2	5	16,5	6:70:24	74:26
LD _{e_L}	9	52	13	7	3	1	9	2	4	7,3	9:75:16	74:26
LD _{e_TF}	33	34	11	8	2	1	8	1	2	13,6	33:54:13	78:22
LD _{e_BF}	21	33	24	6	3	2	6	1	4	14,1	21:51:28	78:22
LD _{e_R}	23	28	31	4	2	2	3	1	6	7,4	23:41:36	82:18

¹ %(m/m), relativamente à percentagem de lenhina em análise

As diferenças anteriormente referidas entre a lenhina *in situ* e a lenhina dioxano isolada, poder-se-ão dever também ao facto da lenhina dioxano possuir maior teor de unidades S, por razões topoquímicas. Contudo, contrariamente ao que sucede com as restantes lenhinas, as proporções H:G:S das lenhinas *in situ* e dioxano do talo floral são semelhantes, o que parece indicar que o efeito topoquímico não é relevante nesta amostra.

Tal como observado na lenhina *in situ*, a elevada proporção de unidades G, em particular na lenhina dos limbos, evidencia a abundância deste tipo de unidades contendo um grupo fenólico livre, em contraste com as unidades S. Por outro lado, o teor de unidades H com grupo hidroxilo fenólico livre é significativamente elevado, em especial nas lenhinas do talo floral seguido das bainhas foliares e do ráquis.

Uma parte significativa da totalidade das unidades estruturais condensadas da lenhina (ca. 42-56%) apresenta ligações β -5, β -6 e α -6, sendo estas mais relevantes nas nervuras/pecíolos e talo floral. As estruturas do tipo bifenilo (**VII**) são também abundantes, representando cerca de 17-36% das estruturas condensadas, sendo a sua contribuição mais uma vez significativa no caso da lenhina do talo floral. As estruturas do tipo éter diarílico (**VIII** e **IX**), que representam cerca de 14-31% das estruturas condensadas, tal como observado nas lenhinas *in situ* são mais abundantes nas nervuras/pecíolos e ráquis.

No que respeita aos rendimentos obtidos na oxidação com permanganato das lenhinas dioxano extraídas, os valores encontram-se próximos aos apresentados por outras plantas anuais [262,263], com excepção da **LD_{e_L}** e da **LD_{e_R}**. O baixo rendimento destas duas

lenhinas poderá ser uma indicação de um teor inferior de grupos hidroxilo fenólico livres nestas partes morfológicas e/ou presença de compostos alifáticos.

Cromatografia de Permeação em Gel

A Figura 4.44 apresenta o perfil de eluição em GPC das lenhinas das cinco partes morfológicas em estudo. Os valores de peso molecular médio ponderado obtidos são apresentados na Tabela 4.35.

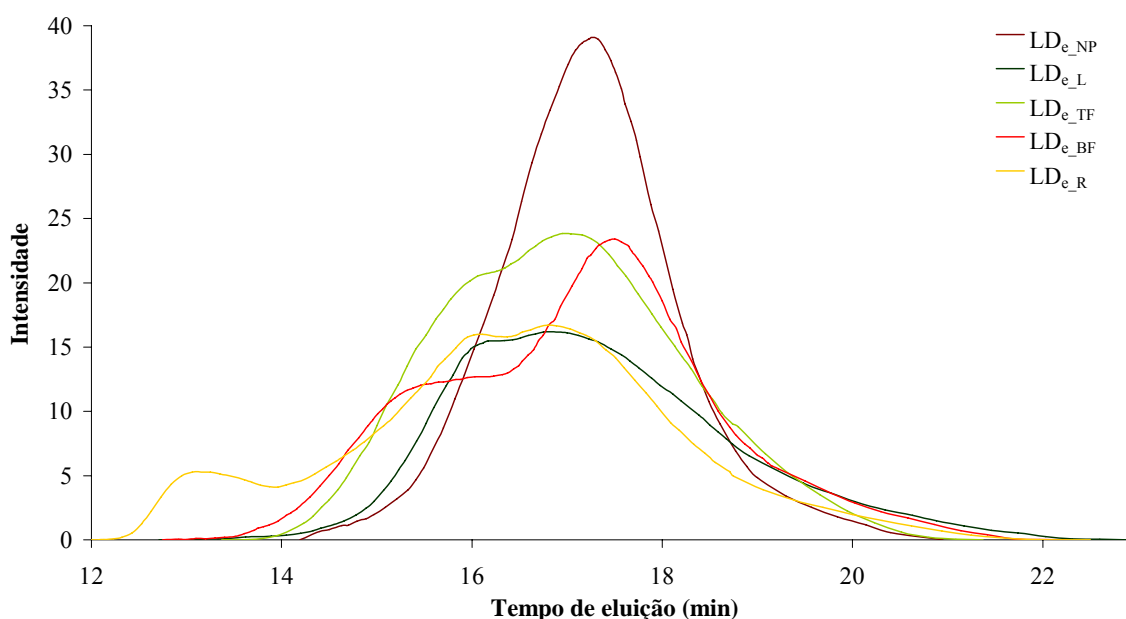


Figura 4.44. Cromatogramas de permeação em gel das lenhinas dioxano LD_e das várias partes morfológicas da ‘Dwarf Cavendish’.

Tabela 4.35. Peso molecular médio ponderado (\overline{M}_w) das lenhinas dioxano LD_e .

Lenhina	\overline{M}_w (Da)
LD_{e_NP}	2700
LD_{e_L}	3450
LD_{e_TF}	3750
LD_{e_BF}	3325
LD_{e_R}	5400

Com exceção das nervuras/pecíolos, a maioria das lenhinas dioxano apresentam uma distribuição bimodal, surgindo o pico de eluição principal entre os 16 e 20 min. No que respeita ao valor de \overline{M}_w para a lenhina LD_{e_NP} este assemelha-se aos obtidos para as

lenhinas de madeiras e para outras plantas anuais [203,212]. No entanto, as restantes lenhinas dioxano apresentam valores de \overline{M}_w superiores.

Espectroscopia de RMN de ^{13}C

A espectroscopia de RMN de ^{13}C líquido é um dos métodos de caracterização da lenhina mais comuns, que permite obter informações acerca da natureza dos carbonos no polímero em termos da sua estrutura química [276].

No presente trabalho, os espectros de RMN de ^{13}C (Figuras 4.45 e 4.46) que serviram de base à caracterização da lenhina foram obtidos em condições de análise quantitativa (secção 3.6.5.2). A atribuição dos sinais foi feita com base na literatura publicada (Tabela 4.36) [257,267,276-282].

Tabela 4.36. Principais regiões de integração dos espectros de RMN de ^{13}C de lenhinas não acetiladas e respectivas atribuições [257,267,276-282].

δ (ppm)	Grupos Estruturais
29,0-32,0	$\underline{\text{C}}$ alifático
51,5-54,0	$\underline{\text{C}}\beta$ em estruturas β - β e β -5
55,0-57,0	$\text{O}\underline{\text{C}}\text{H}_3$
59,0-61,0	$\underline{\text{C}}\gamma$ em ligações β -O-4 sem $\text{C}\alpha=\text{O}$
61,5-62	$\underline{\text{C}}\gamma$ em estruturas do tipo álcool coniferílico
62,5-63,8	$\underline{\text{C}}\gamma$ em ligações β -O-4 com $\text{C}\alpha=\text{O}$; $\underline{\text{C}}\gamma$ em β -1
75,0-76,0	$\underline{\text{C}}\alpha$ em ésteres benzílicos de estruturas β -O-4
156,0-158,0	$\underline{\text{C}}4$ em unidades H
159,0-160,0	$\underline{\text{C}}4$ em unidades de AC esterificadas
160,0-161,0	$\underline{\text{C}}4$ em unidades de AC eterificadas
162,5-164,0	$\underline{\text{C}}4$ em unidades de ácido hidróxibenzóico
165,5-166,9	$\underline{\text{C}}\text{OOR}$ em unidades de AC e AF eterificadas
167,0-167,8	$\underline{\text{C}}\text{OOH}$ em unidades de AC e AF esterificadas
103,0-125,0	$\underline{\text{C}}_{\text{arom}}$ terciários
125,0-138,0	$\underline{\text{C}}_{\text{arom}}$ quaternários não oxigenados
138,0-164,0	$\underline{\text{C}}_{\text{arom}}$ quaternários oxigenados

No caso das lenhinas do talo floral e dos limbos, as lenhinas foram previamente acetiladas, de forma a aumentar a sua solubilidade em DMSO (Figura 4.46). No caso da lenhina dos limbos, o seu espectro de RMN de ^{13}C não é apresentado, devido à

impossibilidade de dissolução da amostra e obtenção de um espectro com resolução adequada ao estudo estrutural.

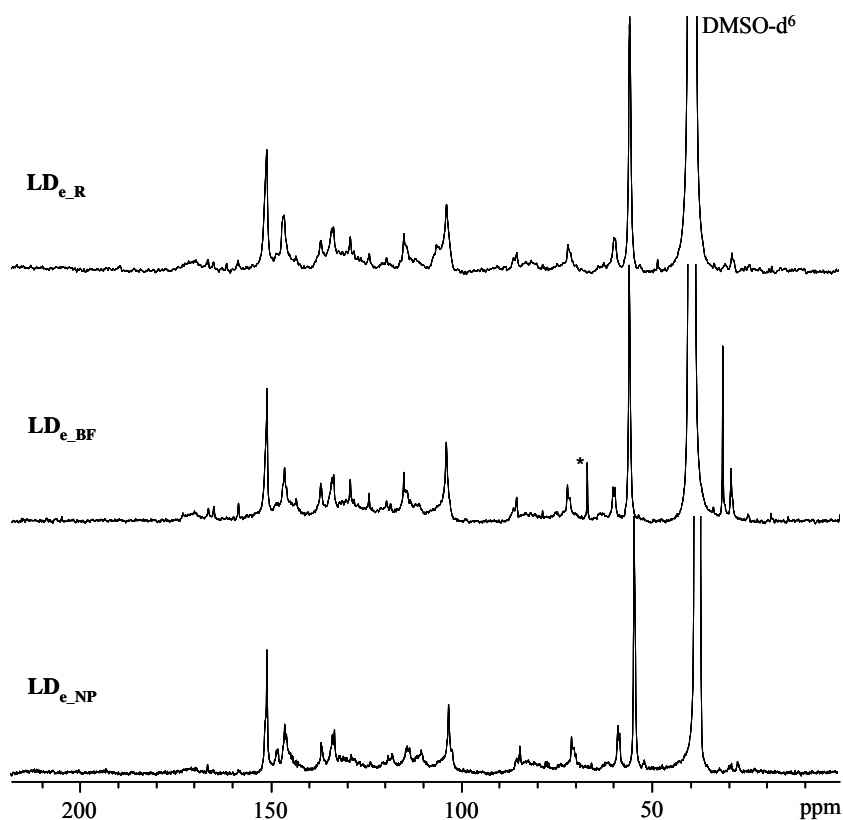


Figura 4.45. Espectros de RMN de ^{13}C quantitativo das lenhinas $\text{LD}_{\text{e_NP}}$, $\text{LD}_{\text{e_BF}}$ e $\text{LD}_{\text{e_R}}$. *Dioxano

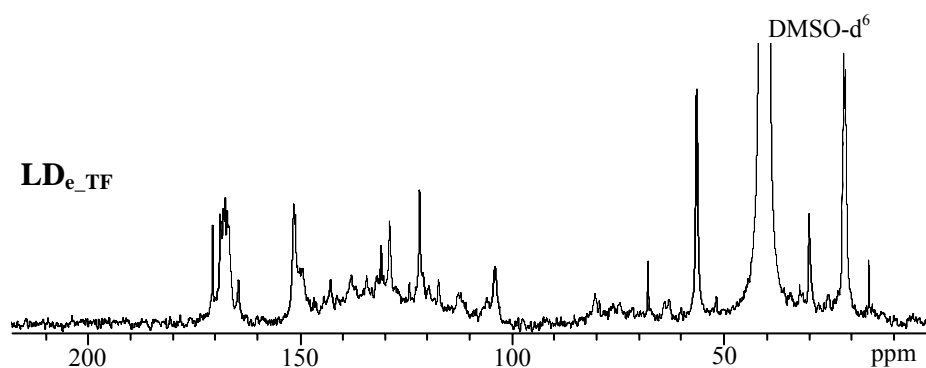


Figura 4.46. Espectro de RMN de ^{13}C quantitativo da lenhina acetilada $\text{LD}_{\text{e_TF}}$.

Com base na metodologia descrita na literatura [267], o cálculo dos elementos estruturais foi efectuado tendo em conta a relação matemática entre os integrais das várias regiões do espectro e o integral de referência correspondente aos carbonos do anel

aromático de uma unidade fenilpropano constituinte da lenhina, após correcção da influência de estruturas olefinicas (Tabela 4.37).

Tabela 4.37. Relações matemáticas utilizadas no estudo quantitativo de lenhinas por RMN de ^{13}C .

Grupos Estruturais	Lenhina não acetilada	Lenhina acetilada
$I_{\text{aromático (corr)}}$	$I_{103-164} - 2I_{166-168} - 2I_{61,5-62}$	$I_{102-154} - I_{118} - I_{143}$
$\beta-\beta + \beta-5$	$(I_{51,5-54,0} \times 6) / (I_{103-164} \text{ (corr)})$	—
$\beta-5 + \beta-1$	—	$(I_{50-52,5} \times 6) / (I_{102-154} \text{ (corr)})$
OCH_3	$(I_{55-57} \times 6) / (I_{103-164} \text{ (corr)})$	$(I_{54,5-56,7} \times 6) / (I_{102-154} \text{ (corr)})$
$\beta-O-4$ sem $\text{C}\alpha=\text{O}$	$(I_{59-61} \times 6) / (I_{103-164} \text{ (corr)})$	$(I_{73-75} \times 6) / (I_{102-154} \text{ (corr)})$
Álcool coniferílico	$(I_{61,5-62} \times 6) / (I_{103-164} \text{ (corr)})$	—
$\beta-O-4$ com $\text{C}\alpha=\text{O}$	$(I_{63} \times 6) / (I_{103-164} \text{ (corr)})$	—
Estruturas benzil e γ -éster	$[(I_{75-76} + I_{64-65}) \times 6] / (I_{103-164} \text{ (corr)})$	$[(I_{78,5-79,5}) \times 6] / (I_{102-154} \text{ (corr)})$
AC + AF (eterificadas)	$[I_{166,3} \times 6] / (I_{103-164} \text{ (corr)})$	—
AC + AF (esterificadas)	$[I_{167,8} \times 6] / (I_{103-164} \text{ (corr)})$	—
AC + AF (totais)	$[(I_{166,3} \times 6) + [I_{167,8} \times 6]] / (I_{103-164} \text{ (corr)})$	$(I_{142,5-144} \times 6) / (I_{102-154} \text{ (corr)})$
AC	$(I_{159-161} \times 6) / (I_{103-164} \text{ (corr)})$	—
AF	$[(I_{166-168} - I_{159-161}) \times 6] / (I_{103-164} \text{ (corr)})$	—
$\text{C}_{\text{arom}}\text{-H}$	$[(I_{103-125} - I_{166-168} - I_{61,5-62}) \times 6] / (I_{103-164} \text{ (corr)})$	$[(I_{102-110}) + (I_{110-124} - I_{117-118} - I_{128,4-130})] / (I_{103-164} \text{ (corr)})$
$\text{C}_{\text{arom}}\text{-C}$	$[(I_{125-137} - I_{166-168} - I_{61,5-62}) \times 6] / (I_{103-164} \text{ (corr)})$	—
$\text{C}_{\text{arom}}\text{-O}$	$[(I_{137-164} - I_{166-168} - I_{61,5-62}) \times 6] / (I_{103-164} \text{ (corr)})$	—
H	$(I_{159-164} \times 6) / (I_{103-164} \text{ (corr)})$	$[(I_{128,4-130})/2 - I_{142,5-144}] \times 6 / (I_{102-154} \text{ (corr)})$
S/G	$I_{103-110} \times 3 / (I_{110-124} - I_{166-168} - I_{61,5-62}) \times 2$	$I_{102-110} \times 3 / (I_{110-124} - I_{117-118} - I_{128,4-130}) \times 2$

Os resultados da quantificação da abundância relativa dos diferentes elementos estruturais das lenhinas por RMN de ^{13}C são apresentados na Tabela 4.38.

Relativamente aos espectros de RMN de ^{13}C quantitativo das lenhinas não acetiladas (Figura 4.45), a ausência dos sinais entre 90 e 103 ppm confirma o baixo teor de hidratos de carbono contaminantes (*ca.* 1%).

O número de grupos metoxilo, por anel aromático, revela mais uma vez que as lenhinas do ráquis e do talo floral possuem, respectivamente, o maior e o menor teor de unidades S em relação às restantes lenhinas. Comparativamente ao número de grupos metoxilo por unidade fenilpropano, calculado a partir da análise elementar e da análise de grupos metoxilo (Tabela 4.32), a quantidade de grupos metoxilo por anel aromático determinado por ^{13}C RMN é ligeiramente superior. Estas diferenças além de estarem relacionadas com as diferentes metodologias subjacentes a cada tipo de determinação,

poder-se-ão também dever à presença de compostos alifáticos covalentemente ligados às lenhinas isoladas, os quais influenciam quer a análise elementar quer a análise dos grupos metoxilo das mesmas.

Tabela 4.38. Frequência de elementos estruturais por anel aromático, obtida por RMN de ^{13}C das lenhinas dioxano **LD_e**.

Grupos Estruturais	Número de grupo ou estrutura/C ₆			
	DL _{e_NP}	DL _{e_TF}	DL _{e_BF}	DL _{e_R}
β -5 e β - β	0,11	—	0,08	0,02
β -5 + β -1	—	0,17	—	—
Grupos OCH ₃	1,36	0,71	1,10	1,55
Estruturas β -O-4 sem C α =O	0,42	0,09	0,27	0,32
Estruturas β -O-4 com C α =O	0,03	—	0,04	0,02
Estruturas do tipo álcool coniferílico	0,04	—	0,02	0,02
Ésteres benzílicos e C γ	0,08	—	0,09	0,05
AC + AF (esterificados)	0,01	—	0,06	0,04
AC + AF (eterificados)	0,02	—	0,06	0,06
AC + AF (totais)	0,03	0,18	0,12	0,10
Ácido <i>p</i> -cumárico	0,01	—	0,07	0,05
Ácido ferúlico	0,02	—	0,05	0,05
C _{Ar} - C	1,37	—	1,41	1,44
C _{Ar} - H	2,41	1,73	2,10	1,87
H:G:S	1:50:49	21:43:36	7:43:50	5:29:66

n.d. – não detectado

A quantificação das ligações condensadas do tipo β - β , β -5 e β -1 (Tabela 4.38), além de demonstrar a presença das referidas estruturas nas várias lenhinas, permite verificar que a lenhina **LD_{e_TF}** é ligeiramente mais rica neste tipo de estruturas (0,17/C₆), em particular de estruturas β -5 e β -1. O teor inferior de ligações do tipo C_{Ar}-H na **LD_{e_TF}** (1,73/C₆) confirma o seu maior grau de condensação, o que vai de encontro com o observado por análise de FTIR e oxidação com permanganato.

Dos diferentes tipos de ligações possíveis entre monómeros na lenhina, as ligações β -O-4 sem grupo carbonilo na posição α da cadeia lateral são as mais frequentes (Tabela 4.38), sendo o seu teor mais elevado na lenhina **LD_{e_NP}**. O teor de estruturas β -O-4 sem grupo carbonilo na posição α na lenhina **LD_{e_TF}** foi determinada a partir da ressonância a

73-75 ppm, visto que o integral a 58-62 ppm, também atribuído a este tipo de estruturas, conduz à obtenção de um teor superior deste tipo de ligações devido à contribuição, para esta mesma ressonância, de outros grupos γ -OH [283]. Em contraste com as restantes partes morfológicas, a lenhina **LD_e_{TF}** apresenta um teor muito baixo deste tipo de estruturas.

As ressonâncias características dos carbonos terciários provenientes das unidades S e das unidades G, assim como as ressonâncias dos carbonos quaternários das unidades H, foram utilizadas no cálculo da proporção H:G:S (Tabela 4.37) [267]. Comparando as proporções H:G:S obtidas por RMN de ¹³C (Tabela 4.38) com as obtidas pelo método de oxidação com permanganato (Tabela 4.34) verifica-se que, embora os valores sejam diferentes, a abundância de determinado tipo de unidade nas lenhinas é confirmado.

Com base na quantidade total de carbonos aromáticos ligados a átomos de carbono pertencente a outra unidade (C_{Ar}-C e C_{Ar}-H) (Tabela 4.38), a ordem do grau de condensação das lenhinas **LD_e_{NP}**, **LD_e_{TF}**, **LD_e_{BF}**, e **LD_e_R**, embora seja idêntica à verificada por FTIR, é inversa à obtida na oxidação com permanganato (Tabela 4.34). Este facto pode ser explicado tendo em conta dois factores:

i) a contribuição dos carbonos aromáticos C1,C2 e C6 em estruturas do tipo ácido cinâmico (AC e AF) e unidades H que surgem nesta região do espectro de RMN de ¹³C (125 a 137 ppm). A abundância superior deste tipo de estruturas na **LD_e_{TF}**, **LD_e_{BF}** e **LD_e_R**, poderão conduzir a uma sobrevalorização dos valores obtidos, indicando por conseguinte um grau de condensação superior ao real.

ii) a lenhina possuir uma distribuição preferencial de grupos fenólicos nas unidades G que, por sua vez, estão envolvidas mais frequentemente em estruturas condensadas. Isto é particularmente evidente para a lenhina **LD_e_{NP}**, pois é a que apresenta um teor superior de unidades G e é a que possui maior percentagem de unidades G condensadas fenólicas relativamente ao total de unidades condensadas (Tabela 4.34). Dado que, por oxidação com permanganato, o teor de unidades G aumenta pela ordem **LD_e_R**, **LD_e_{BF}** \approx **LD_e_{TF}** e **LD_e_{NP}**, é de esperar a inversão observada no grau de condensação pelo método da oxidação com permanganato.

Comparando as intensidades dos sinais a 152,2 ppm (C3 e C5 em unidades S eterificadas) e 149,0-149,5 ppm (C3 em unidades G eterificadas) [277] dos espectros das lenhinas não acetiladas (Figura 4.45), as razões de 12:1 para a **LD_e_{NP}** e 8:1 para a **LD_e_{BF}** e

LD_{e_R}, indicam que: *i*) as unidades S encontram-se maioritariamente eterificadas dando origem a fragmentos moleculares lineares e *ii*) as unidades G encontram-se maioritariamente não-eterificadas e frequentemente envolvidas em ligações carbono-carbono, sendo representativas das unidades de lenhina com um grupo fenólico livre. Este facto contribui também para a abundância superior de unidades G na análise por oxidação com permanganato (Tabela 4.34).

Relativamente ao teor de unidades de ácidos hidroxicinâmicos, a lenhina **LD_{e_TF}** é a que apresenta maior abundância deste tipo de estruturas (Tabela 4.38), o que está de acordo com o observado nos espectros de FTIR, RMN CP/MAS de ¹³C e UV-Visível.

De acordo com os espectros das lenhinas não acetiladas (Figura 4.45), e dado que o sinal a 159,8 ppm (C4 em *p*-cumaratos fenólicos) é mais intenso que o sinal a 160,8 ppm (C4 em *p*-cumaratos não fenólicos), conclui-se que as estruturas de ácido *p*-cumárico nas lenhinas são principalmente unidades fenólicas terminais. Consequentemente, uma parte significativa de estruturas de ácido *p*-cumárico deverá encontrar-se unida por ligações éster a outras subestruturas da lenhina. Contudo, visto que o teor total dos sinais atribuídos às ressonâncias do C α em ésteres benzílicos de estruturas β -O-4 e C γ em estruturas β -O-4 γ -esterificadas é superior ao teor de *p*-cumaratos e ferulatos esterificados (167-168 ppm) indica que as estruturas do tipo ácido hidroxicinâmico não são as únicas que se encontram unidas à lenhina por ligações éster. Estes compostos podem ser compostos do tipo cutina e/ou suberina, embora geralmente estes se encontrem ligados à lenhina por ligações éster via ferulatos [85]. No espectro da lenhina acetilada, a presença das estruturas de ácido *p*-cumárico e ferúlico é evidenciada pelos sinais a 119 e 143 ppm, atribuídos ao C β and C α neste tipo de estruturas, respectivamente. Este tipo de compostos representa cerca de 0,18/C₆, cujo valor foi calculado a partir do integral do sinal a 143 ppm. Dado que o sinal correspondente ao C4 em estruturas de AC e H eterificadas surge a 160-162 ppm [280,283], a sua ausência no espectro da **LD_{e_TF}** (Figura 4.46) indica que a maioria das unidades de ácido *p*-cumárico deverá encontrar-se na forma esterificada. Uma outra indicação da detecção de estruturas de AC esterificadas e eterificadas é a presença dos sinais a 168,8 e 167,5 ppm [280]. Contudo, no caso do espectro acetilado da lenhina **LD_{e_TF}** não é possível a sua quantificação, dado que surgem no mesmo intervalo os sinais fortes atribuídos ao CO em acetatos de alcoóis primários (169,6-172 ppm), alcoóis

secundários (169,6-172 ppm) e fenóis (168,6-166 ppm). Dada a sobreposição de sinais, a quantificação dos grupos OH primários, secundários e fenólicos não foi efectuada.

No caso dos espectros das lenhinas **LD_e_TF** e **LD_e_BF**, a presença das ressonâncias intensas a cerca dos 29 e 31 ppm confirmam que, apesar da remoção da maioria dos compostos alifáticos durante a extracção com clorofórmio, estas lenhinas apresentam uma parte alifática ligada quimicamente tal como sucede em outras lenhinas como a da *Quercus suber* [83,84].

No caso das lenhinas não acetiladas, as estruturas de *p*-cumaratos e ferulatos não esterificadas (integral a 167,0-168,0 ppm) podem estar ligadas a outras sub-estruturas de lenhina por ligações éter ou carbono-carbono. Tendo em conta a quantidade total de *p*-cumaratos e ferulatos e que a maioria das estruturas de ácido *p*-cumárico são unidades fenólicas terminais, a maioria das unidades de ácido ferúlico deverá encontrar-se envolvida em ligações éter.

Comparando as proporções H:G:S obtidas por RMN de ¹³C com as da oxidação com permanganato (Tabela 4.34), verifica-se que os valores diferem entre si, apesar da tendência na abundância relativa das unidades H, G e S entre as várias partes morfológicas ser semelhante. Deste modo, é confirmado o facto da lenhina **LD_e_R** ser a mais rica em unidades S, a **LD_e_NP** em unidades G e a **LD_e_TF** em unidades H.

Espectroscopia de RMN de ¹H

Na maioria dos estudos de RMN de ¹H de lenhinas, de forma a melhorar a resolução dos espectros obtidos, a lenhina é previamente derivatizada. No presente trabalho, a lenhina foi acetilada de forma a bloquear os grupos hidroxilo e impedir a formação de ligações por ponte de hidrogénio, obtendo-se assim um espectro com melhor resolução [257,276].

Os principais grupos funcionais e sub-estruturas da lenhina podem ser determinadas semi-quantitativamente assumindo como referência o sinal de RMN relativo aos prótons do grupo metoxilo (3,6-4,0 ppm), cujo valor correspondente (em nº metoxilos/ufp) foi calculado a partir da percentagem de metoxilos e da análise elementar da lenhina. Os cálculos relativos aos diferentes elementos estruturais foram realizados através da

integração dos intervalos de desvio químico descritos na literatura para a lenhina acetilada (Tabela 4.39) [257,276].

Tabela 4.39. Frequência de elementos estruturais por ufp, obtida por RMN de ^1H das lenhinas acetiladas.

Elemento Estrutural	δ (ppm)	Número de grupo ou estrutura/C ₉			
		LD _{e_NP}	LD _{e_TF}	LD _{e_BF}	LD _{e_R}
-CH ₂ - e -CH ₃	0,7-1,5	0,94	3,88	1,36	1,69
H β em estruturas β - β	3,0-3,15	n.d.	0,02	0,04	n.d.
H α em estruturas β -5 e α -O-4	5,2-5,7	0,24	0,20	0,08	0,03
H α em estruturas β -O-4 sem C α =O	5,9-6,2	0,39	0,19	0,26	0,31
H aromático	6,2-8,0	2,94	3,65	2,17	2,73

n.d. – não detectado

Nos espectros de RMN de ^1H das lenhinas apresentadas na Figura 4.47, os sinais que surgem no intervalo 0,7-1,5 ppm, são em geral atribuídos à ressonância do próton em grupos CH₂ e CH₃ na cadeia alifática da unidade fenilpropano. Contudo, a presença do sinal forte a 1,2-1,3 ppm, atribuído à ressonância de prótons de grupos CH₂ e CH₃ não ligados a oxigénios, indica a presença de uma quantidade significativa de cadeias alifáticas do tipo cutina/suberina ligadas à lenhina [83,84]. De acordo com a Tabela 4.39 verifica-se que a lenhina LD_{e_TF} é a que apresenta maior quantidade de compostos alifáticos, o que vai ao encontro da análise dos espectros de RMN CP/MAS de ^{13}C (Figura 4.35). A seguir à lenhina LD_{e_L}, a LD_{e_TF} é a que apresenta sinais mais intensos na região alifática.

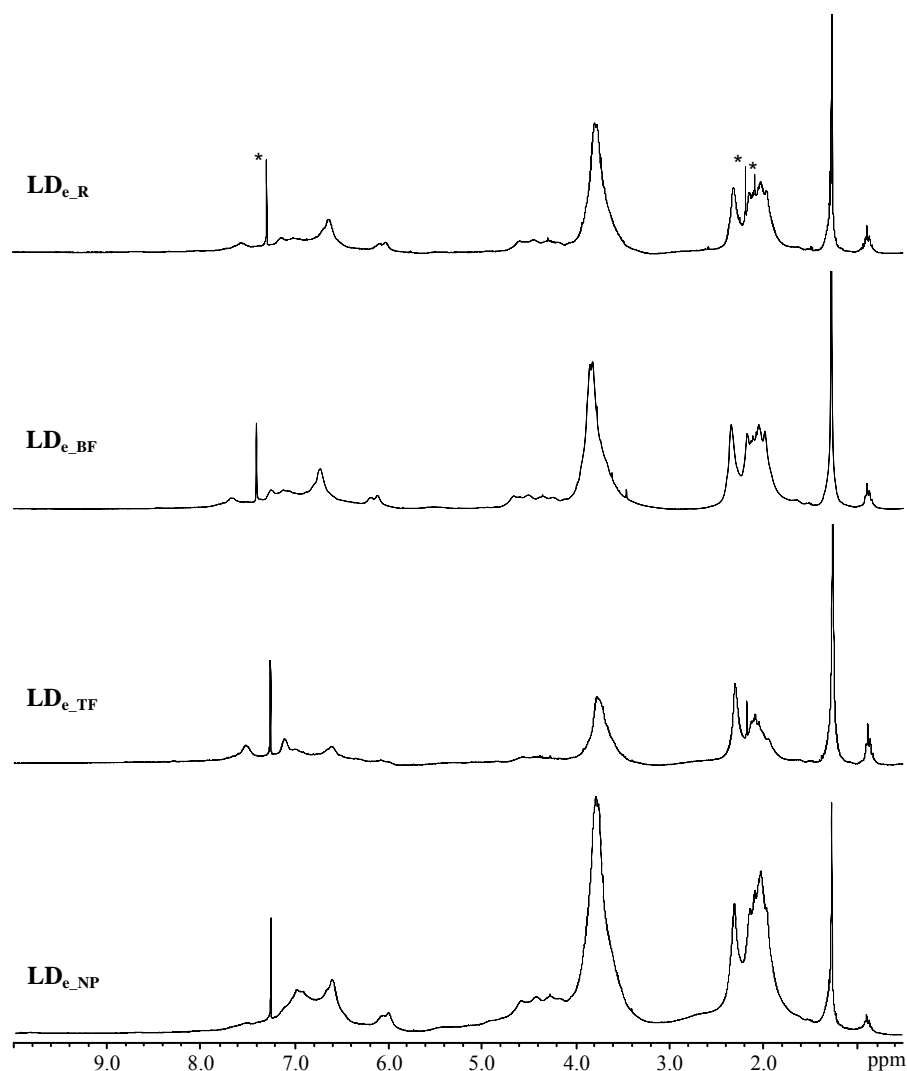


Figura 4.47. Espectros de RMN de ^1H das lenhinas dioxano LD_e acetiladas. $^*\text{CHCl}_3$

A integração dos sinais nos intervalos δ_{H} 1,7-2,2 ppm e 2,2-2,5 ppm permite determinar, respectivamente, o teor de grupos OH alifáticos e OH fenólicos [257]. Contudo, é de realçar que dada a existência de cadeias alifáticas ligadas covalentemente às lenhinas em estudo (incluindo hidroxíácidos), a quantificação dos grupos hidroxilo alifáticos e fenólicos apresentará valores por excesso, visto que os correspondentes derivados acetilados dos grupos OH alifáticos apresentam ressonâncias na mesma região [284].

A quantificação de estruturas do tipo $\beta\text{-}\beta$ foi obtida por integração do sinal correspondente à ressonância $\text{H}\beta$ a 3,0-3,15 ppm. É de salientar que o sinal considerado está localizado na vizinhança de um pico largo e, conseqüentemente, pode causar

interferência nesta determinação, o que demonstra a natureza semi-quantitativa da determinação de estruturas/grupos funcionais por RMN de ^1H em lenhinas. De entre as lenhinas apresentadas na Tabela 4.39, a **LD_e_{BF}** é a que apresenta maior teor de ligações $\beta\text{-}\beta$, sendo este inferior ao observado para várias espécies de madeiras [203].

O sinal no intervalo δ_{H} 5,2-5,7 ppm do espectro RMN de ^1H da lenhina acetilada é essencialmente devido à ressonância de H_α em estruturas $\beta\text{-}5$ (do tipo fenilcumarana, δ_{H} 5,2-5,5 ppm), mas também devido à ressonância de H_α em estruturas $\alpha\text{-}O\text{-}4$ não cíclicas (δ_{H} 5,3-5,7 ppm) [257,281,282]. O número de unidades envolvidas neste tipo de ligações é muito superior nas lenhinas **LD_e_{NP}** (0,24/ C_9) e **LD_e_{TF}** (0,20/ C_9), quando comparado com a **LD_e_{BF}** e **LD_e_R** (0,08 e 0,03/ C_9 , respectivamente).

A abundância de estruturas do tipo $\beta\text{-}O\text{-}4$ foi estimada com base na ressonância do H_α a δ_{H} 5,9-6,2 [257,284]. Comparando os teores deste tipo de estruturas com os obtidos por RMN de ^{13}C , verifica-se que são semelhantes.

O sinal correspondente à ressonância de prótons aromáticos surge a δ_{H} 6,2-8,0 ppm [257]. A frequência deste tipo de prótons nas lenhinas é resultado dos teores de estruturas condensadas e abundância relativa dos três tipos de unidades estruturais (H, G e S). A frequência de prótons aromáticos na lenhina **LD_e_{TF}** é mais elevada que as restantes (Tabela 4.39), o que pode ser explicado pelo seu teor superior em unidades do tipo *p*-hidroxibenzóico.

O sinal a cerca de 7,4-7,6 ppm atribuído aos prótons aromáticos H_2/H_6 e H_α em estruturas do tipo ácido hidroxicinâmico, confirma a presença significativa deste tipo de compostos nas lenhinas analisadas, em particular na lenhina **LD_e_{TF}** (Figura 4.40).

4.4.3.2. LENHINAS DIOXANO – PARTE II

Nesta parte serão discutidos os resultados obtidos para as lenhinas dioxano isoladas pelo método de acidólise original a partir dos materiais SEA e CEA. De forma a distinguir as lenhinas obtidas anteriormente serão designadas por **LD_{SEA}** e **LD_{CEA}**, consoante o tipo de material de partida utilizado para o seu isolamento, SEA e CEA, respectivamente.

Antes da caracterização estrutural das lenhinas **LD_{SEA}** e **LD_{CEA}** propriamente dita, com vista a obter lenhinas purificadas e livres de contaminantes, comparam-se dois métodos de purificação aplicados às lenhinas, de forma a verificar qual o mais adequado.

Efeito da purificação

Dado que o processo de extracção da lenhina dioxano com renovação de solvente e prévia extracção alcalina, deu origem a lenhinas bastante contaminadas e apresentou rendimentos baixos em especial para os limbos e talo floral, foi estudado o isolamento por acidólise segundo o método tradicional de 4h de extracção com e sem pré-extracção alcalina (secção 3.6.1.3).

Por este processo e à semelhança do que tinha acontecido na extracção com renovação de solvente, a lenhina apresentou-se bastante contaminada (Figura 4.47). Dado que no método de purificação dioxano/metanol a lenhina apresentou-se contaminada em elevada extensão por compostos alifáticos e, sendo impossível a caracterização estrutural da lenhina sem purificação prévia, estudou-se um processo de purificação alternativo, de forma a estabelecer qual o método mais adequado à planta em estudo. Este método alternativo consistiu na dissolução da lenhina em 1,2-dicloroetano/etanol, seguida de uma precipitação em éter etílico (P1) e o segundo, como já referido, na dissolução em dioxano/metanol e precipitação em água (P2) (secção 3.6.2). Este estudo, apresentado de seguida, foi efectuado para a lenhina das bainhas foliares (parte maioritária da bananeira) isolada a partir do material SEA e engloba análises de cinzas, hidratos de carbono e várias técnicas de caracterização estrutural. As lenhinas dioxano das bainhas foliares não purificada e purificadas pelos métodos P1 e P2 serão designadas por **LD_{BF_np}**, **LD_{BF_P1}** e **LD_{BF_P2}**, respectivamente.

A Figura 4.48 apresenta os espectros de FTIR e de RMN CP/MAS de ¹³C da lenhina dioxano das bainhas foliares antes e após a purificação pelos dois métodos de purificação (P1 e P2).

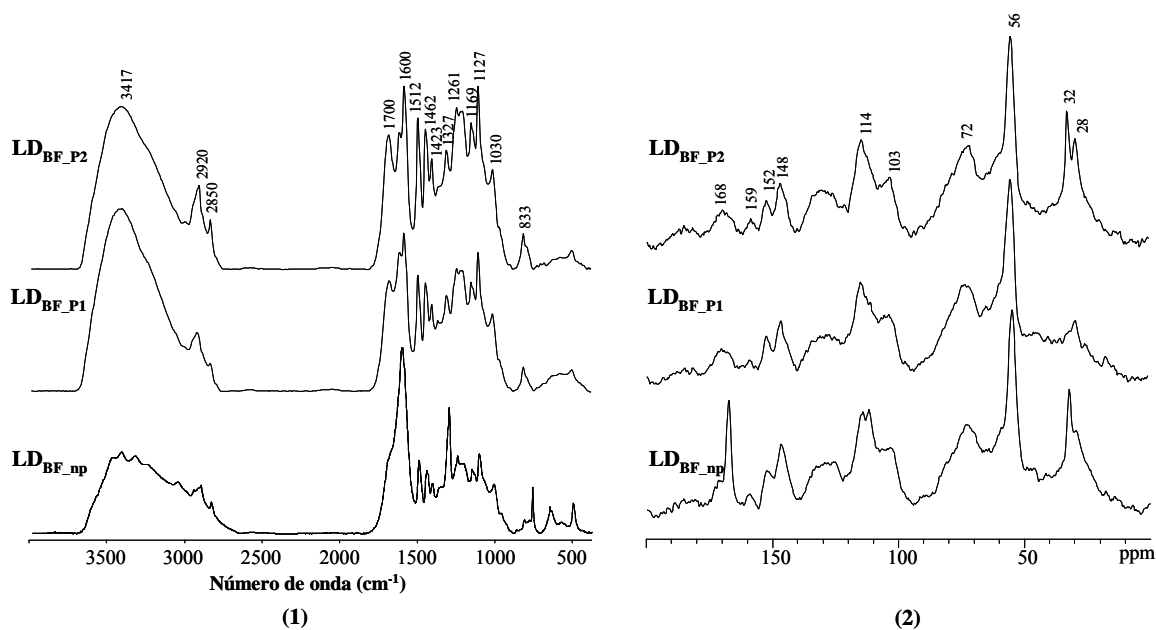


Figura 4.48. Espectros de FTIR (1) e de RMN CP/MAS de ¹³C (2) das lenhinas dioxano das bainhas foliares: não purificada LD_{BF}_np; purificada com 1,2-dicloroetano/etanol LD_{BF}_P1 e purificada com dioxano/metanol LD_{BF}_P2.

Como se torna evidente pelo espectro de FTIR e RMN CP/MAS de ¹³C, não seria possível efectuar qualquer caracterização estrutural rigorosa sem que previamente se efectuasse a sua purificação.

Após o processo de purificação, observam-se diferenças significativas nos espectros de FTIR e de RMN de sólidos, nomeadamente na região alifática e aromática. Com a purificação da lenhina isolada, verifica-se uma melhoria acentuada na definição dos respectivos espectros, em particular nos espectros referentes à lenhina purificada com 1,2-dicloroetano/etanol LD_{BF}_P1, nos quais os sinais atribuídos aos compostos alifáticos diminuíram significativamente em comparação com a LD_{BF}_P2.

Comparando os sinais da região aromática das lenhinas purificadas por ambos os métodos, verifica-se que são semelhantes, pelo que as lenhinas resultantes deverão apresentar-se globalmente semelhantes a nível estrutural.

Comparando os teores de cinzas e hidratos de carbono da lenhina das bainhas foliares antes e após a purificação (Tabela 4.40), confirma-se a presença de elevadas quantidades de cinzas na lenhina isolada. O processo de purificação permitiu um decréscimo significativo no teor de cinzas nas lenhinas purificadas, sendo este mais acentuado pelo

processo P2. As lenhinas isoladas apresentam um baixo teor de hidratos de carbono, que é mantido nas lenhinas purificadas. O ligeiro aumento da percentagem de hidratos de carbono na **LD_{BF_P1}** é devido ao efeito concentração provocado pela remoção das cinzas. Por outro lado, o facto dos hidratos de carbono não serem solúveis em éter etílico, contrariamente ao que sucede no método 2, leva a que precipitem com a lenhina purificada.

Tabela 4.40. Teor de cinzas e hidratos de carbono nas lenhinas das bainhas foliares **LD_{BF_np}**, **LD_{BF_P1}** e **LD_{BF_P2}**.

Lenhina	% Cinzas	% Hidratos de carbono
LD _{BF_np}	15,8	1,4
LD _{BF_P1}	6,0	2,6
LD _{BF_P2}	3,0	1,2

Em termos da análise por permanganato (Tabela 4.41), a lenhina das bainhas foliares antes e após purificação apresenta proporções H:G:S muito semelhantes. Estes resultados indicam que os processos de purificação não afectam a representatividade da lenhina em termos de razão entre unidades.

Tabela 4.41. Resultados da oxidação com permanganato das lenhinas dioxano das bainhas foliares **LD_{BF_np}**, **LD_{BF_P1}** e **LD_{BF_P2}**.

Lenhina	Abundância Relativa, % molar										$\eta\%$ ¹	H:G:S	nC:C
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X			
LD _{BF_np}	36	25	19	6	2	1	9	n.d.	2	n.d.	16,2	36:43:21	80:20
LD _{BF_P1}	35	25	18	7	2	2	8	1	2	n.d.	19,4	35:44:21	78:22
LD _{BF_P2}	32	24	18	8	2	2	10	1	2	n.d.	16,4	32:47:21	74:26

¹ %(m/m), relativamente à percentagem de lenhina total

n.d. – não detectado

Os espectros de RMN de ¹³C e de ¹H das lenhinas **LD_{BF_P1}** e **LD_{BF_P2}** encontram-se apresentadas nas Figuras 4.49 e 4.50 e os respectivos resultados da análise quantitativa nas Tabelas 4.42 e 4.43.

As lenhinas **LD_{BF_P1}** e **LD_{BF_P2}** apresentam espectros de RMN de ¹³C semelhantes, diferindo pontualmente na abundância de determinadas estruturas. Assim, a lenhina **LD_{BF_P1}**, comparativamente à **LD_{BF_P2}**, apresenta uma maior abundância de estruturas do tipo β - β e β -5, β -O-4 sem C α =O, de ésteres benzílicos e de ácido *p*-cumárico (Tabela

4.42). O sinal a cerca de 7,4-7,6 ppm nos espectros de ^1H , atribuído aos prótons aromáticos H2/H6 e H_α em estruturas do tipo ácido *p*-cumárico, confirma a sua maior abundância na lenhina **LD_{BF_P1}** (Figura 4.50, Tabela 4.43).

A presença de compostos alifáticos é menos evidente nos espectros da lenhina **LD_{BF_P1}** (Figuras 4.49 e 4.50), o que indica a eficácia do método P1 na extracção deste tipo de contaminantes (Tabela 4.43).

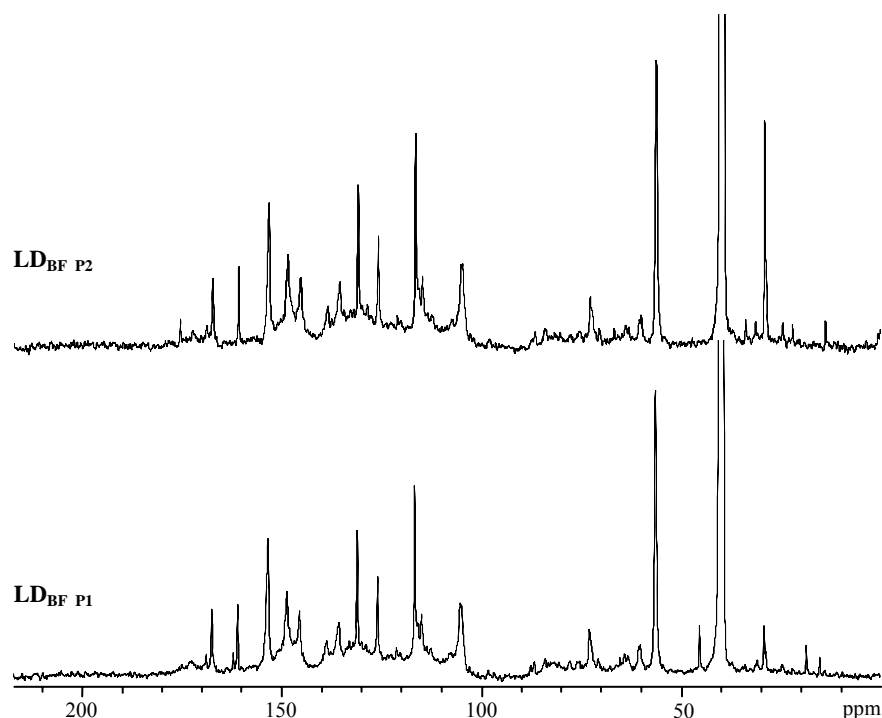


Figura 4.49. Espectros de RMN de ^{13}C quantitativo das lenhinas **LD_{BF_P1}** e **LD_{BF_P2}**.

Tabela 4.42. Frequência de elementos estruturais por anel aromático, obtida por RMN de ^{13}C das lenhinas dioxano **LD_{BF_P1}** e **LD_{BF_P2}**.

Elemento Estrutural	Número de grupo ou estrutura/ C_6	
	LD_{BF_P1}	LD_{BF_P2}
β -5 e β - β	0,06	0,04
Grupos OCH_3	0,83	0,81
Estruturas β -O-4 sem $\text{C}\alpha=\text{O}$	0,19	0,11
Estruturas β -O-4 com $\text{C}\alpha=\text{O}$	0,06	0,07
Estruturas do tipo álcool coniferílico	0,02	0,02
Ésteres benzílicos e $\text{C}\gamma$	0,12	0,07
Ácido <i>p</i> -cumárico	0,16	0,11
Ácido ferúlico	0,04	0,07
H:G:S	16:46:38	11:48:41

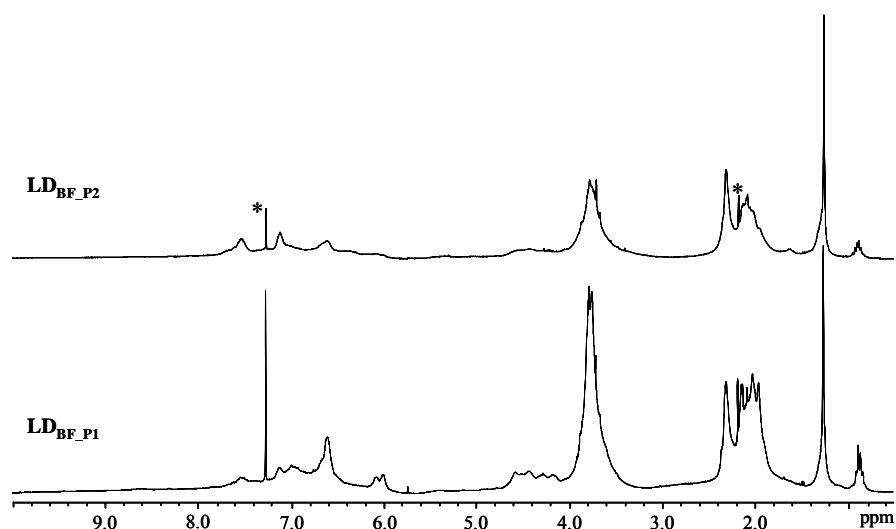


Figura 4.50. Espectros de RMN de ^1H das lenhinas dioxano $\text{LD}_{\text{BF_P1}}$ e $\text{LD}_{\text{BF_P2}}$.

Tabela 4.43. Frequência de elementos estruturais por ufp, obtida por RMN de ^1H das lenhinas dioxano acetiladas $\text{LD}_{\text{BF_P1}}$ e $\text{LD}_{\text{BF_P2}}$.

Elemento Estrutural	δ (ppm)	Número de grupo ou estrutura/ C_9	
		$\text{LD}_{\text{BF_P1}}$	$\text{LD}_{\text{BF_P2}}$
$-\text{CH}_2-$ e $-\text{CH}_3$	0,7-1,5	1,12	1,36
$\text{H}\beta$ em estruturas $\beta-\beta$	3,0-3,15	0,08	0,03
$\text{H}\alpha$ em estruturas $\beta\text{-O-4}$ sem $\text{C}\alpha=\text{O}$	5,9-6,2	0,18	0,10
H aromático	6,2-8,0	3,48	2,23

Comparando os resultados obtidos pelas várias técnicas de caracterização, verifica-se que, de entre os métodos de purificação utilizados, o mais eficaz é o que envolve a dissolução da lenhina em 1,2-dicloroetano/etanol seguida da precipitação em éter etílico. Por este método, para além de se obter uma lenhina representativa da lenhina isolada, a lenhina apresenta-se menos contaminada por compostos alifáticos. Assim, dadas as vantagens apresentadas por este método de purificação, o mesmo foi aplicado às lenhinas das restantes partes morfológicas, dando continuidade ao estudo de caracterização estrutural.

Caracterização das lenhinas Dioxano LD_{SEA} e LD_{CEA}

No primeiro estudo efectuado, e tendo por base a presença de estruturas de taninos na lenhina isolada, foi efectuada a pré-extracção alcalina das lenhinas. Sendo um processo bastante moroso e que poderá afectar a lenhina isolada efectuou-se o estudo da influência da pré-extracção alcalina na estrutura das lenhinas isoladas. Para tal, as lenhinas SEA e CEA foram de igual modo caracterizadas por análise química, oxidação com permanganato, RMN de ^{13}C e ^1H e ainda por GPC.

As lenhinas dioxano foram isoladas pelo método original de acidólise suave sem renovação de solvente (secção 3.6.1.3). Os rendimentos de lenhina obtidos para cada parte morfológica antes e após a purificação encontram-se na Tabela 4.44.

Tabela 4.44. Rendimentos de extracção das lenhinas dioxano LD_{SEA} e LD_{CEA} antes e após purificação.

		LD _{NP}	LD _L	LD _{TF}	LD _{BF}	LD _R
SEA	Lenhina extraída ¹	62,0	29,0	40,8	69,1	40,0
	Lenhina purificada ²	40,1	26,5	25,7	49,0	28,8
CEA	Lenhina extraída ¹	80,5	25,9	58,4	45,7	32,5
	Lenhina purificada ²	40,0	17,1	30,4	19,8	24,8

¹ %, relativamente à lenhina de Klason determinada no material sem extractáveis (SEA) e após a pré-extracção alcalina (CEA)

² Purificação efectuada por dissolução em 1,2-dicloroetano/etanol e precipitação em éter etílico.

Comparando os valores obtidos a partir do material sem e com pré-extracção alcalina verifica-se que são semelhantes, com excepção das nervuras/peciolos e o talo floral, nas quais verificou-se um aumento de cerca de 20% no rendimento no método CEA (Tabela 4.44).

Analisando os rendimentos em termos de lenhina purificada, verifica-se que uma parte significativa do material extraído é eliminado durante o processo de purificação, o que poderá ser indicativo da presença de quantidades consideráveis de contaminantes, tais como cinzas e alifáticos. Comparando o rendimento da lenhina purificada e isolada a partir do material sem e com pré-extracção alcalina, verifica-se que embora o rendimento de extracção possa ser superior no segundo caso, a percentagem de lenhina purificada é menor (43-76%) em comparação com a primeira (63-91%), o que significa que a fracção isolada a partir do material com pré-extracção alcalina encontra-se mais contaminada.

Comparando as lenhinas isoladas a partir do material sujeito a pré-extracção alcalina, de um modo geral, os rendimentos do isolamento das lenhinas pelo método original, são superiores aos obtidos pelo método de acidólise com renovação de solvente (Tabela 4.25), tendo atingido no caso das nervuras/pecíolos e bainhas foliares o dobro do valor. No caso dos limbos, apesar de, contrariamente às restantes partes morfológicas, o rendimento obtido no método sem renovação de solvente ter sido ligeiramente inferior, em termos de percentagem de lenhina purificada (66%) o valor é superior ao obtido pelo método com renovação de solvente (39%). Este facto parece indicar que neste último caso é obtida uma fracção aromática mais contaminada.

Espectroscopia de RMN CP/MAS de ^{13}C

Quando comparados, os espectros de RMN de ^{13}C de estado sólido referentes às lenhinas extraídas no material sem e com pré-extracção alcalina exibem algumas diferenças (Figura 4.51).

Da análise dos espectros das lenhinas isoladas a partir do material sem pré-extracção alcalina (Figura 4.51) verifica-se que, no espectro dos limbos e talo floral, os sinais atribuídos à presença de cadeias alifáticas ligadas covalentemente à lenhina são mais intensos comparativamente com as restantes partes. No que diz respeito às lenhinas **LD_{CEA}** (Figura 4.51), verifica-se um ligeiro incremento na intensidade dos sinais atribuídos aos compostos alifáticos, sendo este mais intenso nos espectros da lenhina do talo floral.

Pelos espectros das lenhinas **LD_{SEA}** verifica-se que de acordo com o sinal a *ca.* 103 ppm, as unidades S são mais abundantes na **LD_{SEA_NP}** e na **LD_{SEA_R}** enquanto que o sinal a 114 ppm, atribuído à unidade G apresenta-se com maior relevância na lenhina **LD_{SEA_TF}**. Comparando as intensidades dos sinais a 103 e 114 ppm das várias partes morfológicas, verifica-se que a razão G/S deverá ser superior nas lenhinas **LD_{SEA_TF}**, **LD_{SEA_L}** e **LD_{SEA_BF}**. Por outro lado, as **LD_{SEA_NP}** e **LD_{SEA_R}** deverão apresentar razões G/S inferiores, dado que a intensidades destes dois sinais é muito próximo (Figura 4.51).

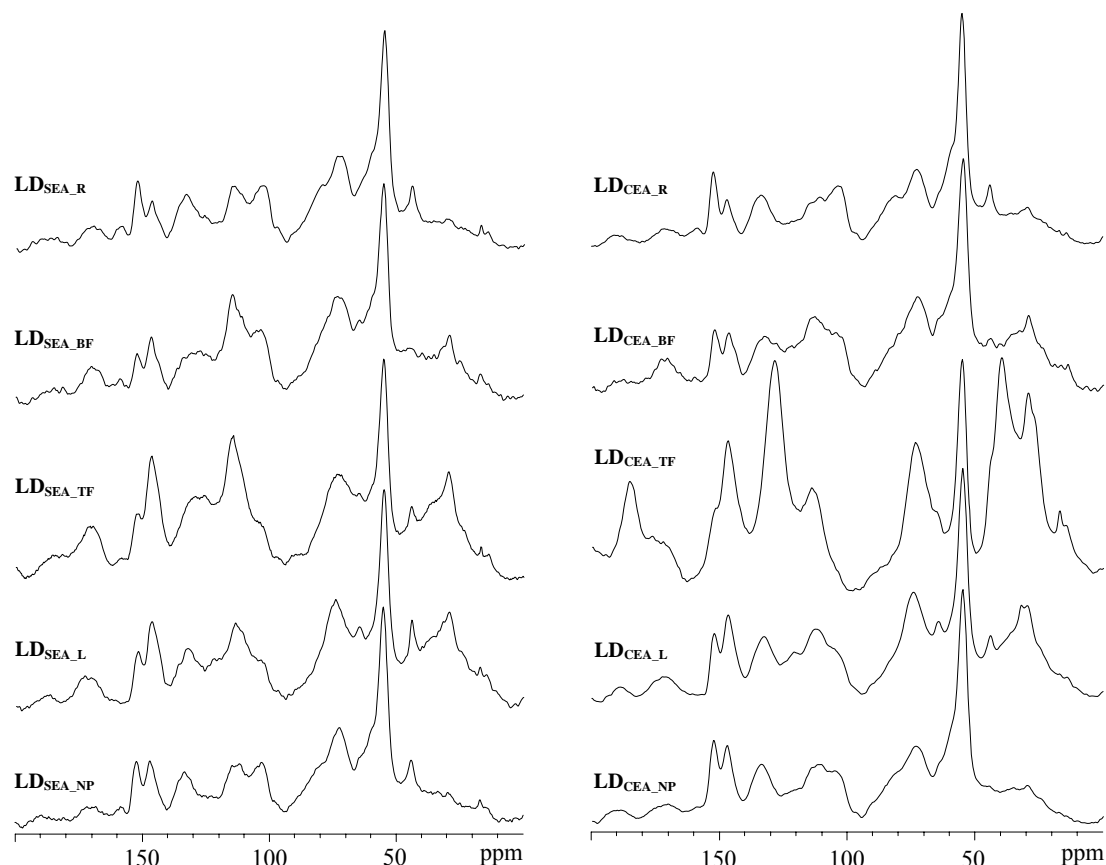


Figura 4.51. Espectros de RMN CP/MAS ^{13}C das lenhinas dioxano isoladas a partir do material SEA (LD_{SEA}) e CEA (LD_{CEA}).

O sinal atribuído à unidade H (159 ppm), embora não seja observável na maioria dos espectros, é visível nos espectros das lenhinas LD_{SEA} e LD_{CEA} das bainhas foliares ($\text{LD}_{\text{SEA_BF}}$ e $\text{LD}_{\text{CEA_BF}}$, respectivamente) e do ráquis ($\text{LD}_{\text{SEA_R}}$ e $\text{LD}_{\text{CEA_R}}$, respectivamente), o que poderá indicar um teor superior deste tipo de unidades nas lenhinas destas partes morfológicas.

No caso das lenhinas LD_{CEA} , comparando as intensidades dos sinais a 103 e 114 ppm, verifica-se que o sinal a 114 ppm é mais intenso que o sinal a 103 ppm, na maioria dos espectros, com exceção da lenhina $\text{LD}_{\text{CEA_R}}$ em que as unidades S parecem ser mais abundantes que as unidades G. Consequentemente, é de esperar que a razão G/S da lenhina do ráquis $\text{LD}_{\text{CEA_R}}$ seja inferior a 1, enquanto que para as restantes partes morfológicas os valores deverão ser superiores à unidade. É de salientar que no caso do espectro da lenhina do talo floral $\text{LD}_{\text{CEA_TF}}$, os sinais a 103 e 153 ppm não são visíveis, indicando desta forma que as unidades S deverão estar presentes em muito pequenas quantidades, tal como verificado nas lenhinas LD_e (Secção 4.4.3.1).

Deste modo, a realização de uma extracção alcalina antes do isolamento das lenhinas, parece ter influenciado nas proporções G/S, com uma ligeira perda de unidades S e/ou favorecimento na extracção de unidades G.

Fórmula Empírica

A Tabela 4.45 apresenta a composição em carbono, hidrogénio e oxigénio, corrigida para o teor em cinzas e hidratos de carbono, das lenhinas isoladas pelo método de acidólise original, assim como as percentagens de grupos metoxilos e as fórmulas empíricas calculadas a partir destes valores.

Tabela 4.45. Análise elementar, percentagem de metoxilos e fórmulas empíricas das ufp das lenhinas dioxano **LD_{SEA}** e **LD_{CEA}**.

Análise Elementar (% <i>, m/m</i>) ¹							
Lenhina	Método	C	H	O	%OCH ₃	Fórmula Empírica	M _{ufp}
LD _{NP}	SEA	56,35	5,60	38,05	17,4	C ₉ H _{6,70} O _{3,11} (OCH ₃) _{0,96}	171,2
	CEA	58,50	5,65	35,85	17,0	C ₉ H _{6,65} O _{2,81} (OCH ₃) _{0,91}	166,0
LD _L	SEA	59,13	6,57	34,30	13,2	C ₉ H _{8,90} O _{2,89} (OCH ₃) _{0,72}	168,1
	CEA	58,93	6,00	35,07	14,4	C ₉ H _{7,70} O _{2,89} (OCH ₃) _{0,78}	167,4
LD _{TF}	SEA	58,78	5,20	36,02	9,5	C ₉ H _{7,40} O _{3,36} (OCH ₃) _{0,53}	172,9
	CEA	64,68	6,21	29,10	10,2	C ₉ H _{8,22} O _{2,34} (OCH ₃) _{0,52}	157,3
LD _{BF}	SEA	58,56	6,25	35,19	12,5	C ₉ H _{8,59} O _{3,06} (OCH ₃) _{0,69}	170,4
	CEA	58,62	5,82	35,56	12,1	C ₉ H _{7,93} O _{3,13} (OCH ₃) _{0,67}	170,6
LD _R	SEA	57,41	5,69	36,90	17,2	C ₉ H _{6,77} O _{2,95} (OCH ₃) _{0,94}	168,5
	CEA	56,48	5,53	37,99	16,2	C ₉ H _{6,82} O _{3,19} (OCH ₃) _{0,90}	172,1

¹ Valores corrigidos para o teor em cinzas e monossacarídeos

A diferença na percentagem de grupos metoxilo entre as várias lenhinas reflecte as diferenças já observadas anteriormente na análise das lenhinas isoladas pelo método dioxano com renovação de solvente e com pré-extracção alcalina (Secção 4.4.3.1). O teor mais elevado de grupos metoxilo das lenhinas das nervuras/peciós e ráquis confirma mais uma vez que as unidades S são mais abundantes nestas partes morfológicas.

Quanto ao efeito da pré-extracção alcalina na estrutura da lenhina isolada verifica-se que não existem alterações significativas no teor de grupos metoxilo, verificando-se contudo, no caso da lenhina do talo floral, uma diminuição significativa na proporção de oxigénio.

Analogamente aos estudos efectuados para o processo com renovação de solvente, foi efectuado o estudo dos hidratos de carbono nas lenhinas isoladas (Tabela 4.46).

As lenhinas dioxano isoladas a partir do material SEA apresentam teores superiores de hidratos de carbono relativamente às isoladas a partir do material CEA (Tabela 4.47). Este facto pode ser justificado tendo em conta a solubilidade dos polissacarídeos em meio alcalino. Relativamente aos teores de hidratos de carbono encontrados para as lenhinas isoladas a partir do método de acidólise, sem e com renovação de solvente e com pré-extracção alcalina, verifica-se que são semelhantes.

Tabela 4.46. Composição média em monossacarídeos (% m/m, na forma anidra) das lenhinas dioxano **LD_{SEA}** e **LD_{CEA}**.

Lenhina	Método	% (m/m) monossacarídeo							
		Ramn	Fuc	Ara	Xil	Man	Gal	Gluc	Total
LD _{NP}	SEA	0,1	<0,05	0,7	1,7	<0,05	0,1	0,3	2,9
	CEA	<0,05	0,1	0,1	0,3	0,1	<0,05	0,1	0,7
LD _L	SEA	0,1	0,1	0,4	0,4	<0,05	0,1	0,3	1,4
	CEA	<0,05	<0,05	0,2	0,2	<0,05	0,1	0,2	0,7
LD _{TF}	SEA	0,1	0,1	0,4	0,6	<0,05	0,1	1,1	2,4
	CEA	<0,05	n.d.	0,1	0,1	n.d.	0,1	0,5	0,8
LD _{BF}	SEA	<0,05	<0,05	0,8	1,0	0,1	0,2	0,5	2,6
	CEA	0,1	<0,05	0,2	0,1	<0,05	0,1	0,3	0,8
LD _R	SEA	0,1	<0,05	0,4	1,2	<0,05	0,1	0,2	2,0
	CEA	<0,05	<0,05	0,1	0,2	n.d.	0,1	0,1	0,5

n.d.-não detectado

Oxidação com permanganato

A oxidação com permanganato das lenhinas isoladas pelo método original a partir do material SEA e CEA conduziu à formação dos produtos indicados na Figura 4.29 e cujos resultados se encontram na Tabela 4.47.

Como já foi referido, enquanto que os compostos **I-X** têm origem nas unidades estruturais da lenhina com grupo hidroxilo fenólico livre, o composto **A** resulta da oxidação de taninos hidrolizáveis como o ácido gálico e seus derivados ou taninos condensados como a catequina. As lenhinas isoladas a partir do material SEA apresentaram-se contaminadas com 2-5% de composto **A**, sendo os limbos e o talo floral as

partes morfológicas onde este produto se apresentou mais abundante (*ca.* 5%). Por outro lado, partindo do material CEA resultaram lenhinas menos contaminadas, atingindo o produto **A**, quando existente, um teor máximo de 1%.

Tabela 4.47. Resultados da oxidação com permanganato das lenhinas dioxano **LD_{SEA}** e **LD_{CEA}** (Figura 4.29).

		Abundância Relativa, mol%												
	Lenhina	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	$\eta\%$ ¹	H:G:S	nC:C
SEA	LD _{NP}	14	38	27	4	4	2	5	1	5	n.d.	16,1	14:55:32	79:21
	LD _L	5	53	15	7	3	2	8	2	4	1	23,5	6:76:18	73:27
	LD _{TF}	24	37	9	9	2	3	12	1	1	1	11,6	24:63:13	70:30
	LD _{BF}	32	24	18	8	2	2	10	1	2	n.d.	16,4	32:47:21	74:26
	LD _R	37	23	23	4	2	2	5	1	3	n.d.	12,5	37:36:27	83:17
CEA	LD _{NP}	8	41	31	4	3	2	4	2	6	n.d.	14,9	8:57:35	80:20
	LD _L	3	53	21	5	3	1	7	2	4	1	14,4	4:72:24	77:23
	LD _{TF}	11	57	5	9	3	1	9	2	1	1	14,8	12:81:7	73:27
	LD _{BF}	17	39	17	8	3	2	9	2	3	n.d.	11,6	17:62:21	73:27
	LD _R	16	34	31	4	3	n.d.	4	1	6	n.d.	12,7	16:50:34	81:19

¹ %(m/m), relativamente à percentagem de lenhina total; n.d. - não detectado

As proporções molares das unidades H, G e S fenólicas não condensadas (produtos **I**, **II** e **III**) das lenhinas isoladas a partir do material SEA e CEA são consideravelmente diferentes. As lenhinas isoladas a partir do material CEA apresentam teores mais baixos de unidades H e na maioria dos casos, teores superiores de unidades G e S, comparativamente às suas homólogas.

A diminuição acentuada no teor de unidades H nas lenhinas isoladas a partir do material CEA vai ao encontro do observado nas lenhinas *in situ* (secção 4.4.1). Este facto pode ser explicado tendo em conta que, para além do ácido *p*-hidroxibenzóico, as estruturas do tipo cumarato contribuem, após a oxidação com permanganato, para a formação do produto **I**. Atendendo a que este tipo de unidades encontra-se na sua maioria esterificada com a lenhina e dada a labilidade das ligações éster em meio alcalino, é de esperar que uma fracção deste tipo de ácido cinâmico se solubilize em meio básico, diminuindo consequentemente o seu teor na lenhina isolada. Consequentemente, as lenhinas **LD_{CEA}** apresentam em geral teores superiores de unidades G e S.

Relativamente à proporção relativa dos produtos resultantes de estruturas condensadas, as lenhinas isoladas a partir do material SEA e CEA apresentam algumas

diferenças entre si. A frequência dos compostos **IV-VI** nas lenhinas em análise, indica que, em geral, houve um ligeiro decréscimo no teor de unidades estruturais da lenhina envolvidas em ligações β -5, β -6 e α -6, passando de 10-14% para 7-13% nas lenhinas isoladas a partir do material CEA. O mesmo sucede com as estruturas do tipo bifenilo (produto **VII** - 5-12% para 4-9%, respectivamente). Quanto às estruturas do tipo éter diarílico (produtos **VIII** e **IX**), a sua variação foi mínima, verificando-se que constituem cerca de 1-6% da totalidade das unidades estruturais condensadas.

Comparativamente às lenhinas isoladas com renovação de solvente, nas lenhinas isoladas pelo método de acidólise original foi possível a identificação da estrutura condensada **X**, que comprova o envolvimento de uma fracção de unidades H em ligações C-C pela posição C5 do anel aromático (Figura 4.39).

As lenhinas SEA apresentam um grau de condensação ligeiramente superior que as homólogas CEA (Tabela 4.47), representando em ambos os casos cerca de 17-30% dos monómeros da lenhina. Estes valores são mais elevados quando comparados com os obtidos pela mesma técnica para outras espécies de plantas anuais [43,165,262], sendo, no entanto, muito próximos aos obtidos para as madeiras [203,267].

No que respeita aos rendimentos obtidos na oxidação com permanganato, os valores estão dentro dos normalmente obtidos para este procedimento (8,5-21%) [203,262,263,267]. Comparando os rendimentos das lenhinas isoladas a partir do material SEA e CEA verifica-se que, na maioria dos casos, ocorre uma ligeira diminuição nos valores, o que poderá dever-se à extracção das estruturas do tipo cumarato durante o processo de extracção alcalina, que em geral são unidades terminais esterificadas e consequentemente facilmente acessíveis à oxidação com permanganato.

Comparando os resultados das lenhinas isoladas a partir do material sujeito a pré-extracção alcalina pelo método de acidólise sem e com renovação de solvente, verificam-se diferenças significativas. A diferença mais notória reside no facto da maioria das lenhinas isoladas pelo método de acidólise sem renovação de solvente serem mais ricas em unidades H comparativamente com as resultantes pelo método com renovação de solvente. Relativamente às unidades G e S não se verifica um comportamento padrão, observando-se apenas que contrariamente ao que sucede com as nervuras/pecíolos e limbos, no talo floral, bainhas foliares e ráquis, a proporção de unidades G aumenta e as unidades S diminuem nas **LD**_{CEA}.

Relativamente à proporção de estruturas condensadas (IV-X) verifica-se que, na maioria das partes morfológicas (talo floral, bainhas foliares e ráquis), obtiveram-se lenhinas LDe (Tabela 4.34) menos condensadas que as correspondentes **LD_{CEA}** (Tabela 4.47), o que não sucede com as **LD_{e_NP}** e **LD_{e_L}**. O maior grau de condensação nas lenhinas **LD_{e_NP}** e **LD_{e_L}** pode ser atribuída ao teor superior em unidades G fenólicas, as quais estão mais frequentemente envolvidas em estruturas condensadas.

Cromatografia de Permeação em Gel

Os perfis de eluição em GPC das lenhinas SEA e CEA isoladas a partir do método de acidólise sem renovação de solvente estão apresentados na Figura 4.52 e os valores de peso molecular médio ponderado na Tabela 4.48.

Comparando os perfis de GPC das lenhinas SEA e CEA verifica-se que em algumas partes morfológicas existiram alterações significativas na estrutura da lenhina.

Enquanto que as lenhinas SEA apresentam uma distribuição unimodal com valores \overline{M}_w semelhantes aos obtidos para as madeiras [203], algumas lenhinas CEA, nomeadamente o talo floral e as bainhas foliares, apresentam distribuições bimodais. Estas distribuições multimodais revelam que as lenhinas em causa são estruturalmente heterogéneas devendo apresentar fracções de compostos com pesos moleculares ponderados diferentes ou com uma estrutura ramificada distinta e por conseguinte com diferentes volumes hidrodinâmicos.

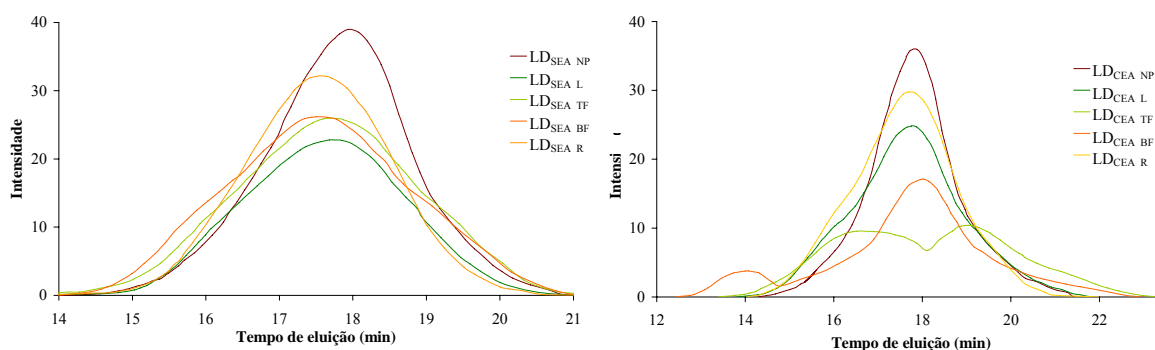


Figura 4.52. Cromatogramas de permeação em gel das lenhinas dioxano LD_{SEA} e LD_{CEA}.

Tabela 4.48. Peso molecular médio ponderado \overline{M}_w das lenhinas dioxano **LD_{SEA}** e **LD_{CEA}**.

Lenhina	\overline{M}_w (Da)	
	SEA	CEA
LD _{NP}	1900	2000
LD _L	2200	2200
LD _{TF}	2400	1950
LD _{BF}	2500	2400
LD _R	2200	2400

Contrariamente ao que sucede com as lenhinas SEA e CEA das nervuras/pecíolos, limbos e ráquis, que apresentam distribuições e valores de \overline{M}_w semelhantes, as lenhinas SEA e CEA do talo floral e bainhas foliares diferem significativamente. No caso da lenhina do talo floral, a lenhina SEA apresenta uma distribuição unimodal com um \overline{M}_w de 2400 Da, enquanto que a lenhina CEA, para além de passar a apresentar uma distribuição bimodal, possui um \overline{M}_w significativamente inferior à homóloga (1950 Da). No caso da lenhina das bainhas foliares embora ambas as lenhinas apresentem valores de \overline{M}_w semelhantes, a lenhina CEA apresenta uma distribuição bimodal. No caso da lenhina **LD_{CEA_TF}**, a sua estrutura heterogénea poderá dever-se à presença de compostos alifáticos covalentemente ligados à fracção aromática, como confirmado pelo respectivo espectro de RMN CP/MAS de ^{13}C (Figura 4.51).

Espectroscopia de RMN de ^{13}C

Os espectros de RMN de ^{13}C obtidos para as lenhinas dioxano isoladas a partir do material sem e com pré-extracção alcalina, estão apresentados nas Figuras 4.53 e 4.54. Tal como efectuado anteriormente, a sua discussão será baseada na atribuição dos sinais de ressonância e nos resultados da análise quantitativa por RMN de ^{13}C (Tabela 4.36).

Analisando os espectros das lenhinas **LD_{SEA}** e **LD_{CEA}** (Figuras 4.53 e 4.54) verifica-se que, tal como nas lenhinas isoladas pelo método com renovação de solvente, os sinais a 90-103 ppm atribuídos à presença de hidratos de carbono são inexistentes o que está de acordo com o baixo teor de hidratos de carbono obtido (Tabela 4.46).

O número de grupos metoxilo por unidade fenilpropano calculado a partir da análise elementar e dos grupos metoxilo (Tabela 4.45) assim como as proporções HGS obtidas na oxidação com permanganato (Tabela 4.47) demonstram que as lenhinas do ráquis e do talo floral são as que possuem o maior e o menor teor de unidades S. É de referir que, os valores de grupos metoxilo obtidos para as lenhinas SEA e CEA são semelhantes, tendo-se verificado apenas um ligeiro aumento no valor da lenhina das bainhas foliares. Por outro lado, comparando os valores obtidos das lenhinas **LD_{SEA}** e **LD_{CEA}** com os das lenhinas isoladas pelo método de acidólise com renovação de solvente, verifica-se que, com excepção da lenhina do talo floral, foram obtidos teores ligeiramente superiores de grupos metoxilo nas últimas.

Tal como observado pelo isolamento com renovação de solvente, o número de grupos metoxilo por unidade fenilpropano (Tabela 4.45) é ligeiramente inferior à quantidade de grupos metoxilo por anel aromático determinado por RMN de ^{13}C . Mais uma vez, estas diferenças além de estarem relacionadas com as diferentes metodologias subjacentes a cada tipo de determinação, poder-se-ão também dever à presença de compostos alifáticos covalentemente ligados às lenhinas isoladas.

Tabela 4.49. Frequência de elementos estruturais por anel aromático, obtida por RMN de ^{13}C das lenhinas dioxano **LD_{SEA}** e **LD_{CEA}** (consultar tabelas 4.36 e 4.37).

Elemento Estrutural	Número de grupo ou estrutura/C ₆								
	LD _{NP}		LD _L		LD _{TF}	LD _{BF}		LD _R	
	SEA	CEA	SEA	CEA	SEA	SEA	CEA	SEA	CEA
β -5 e β - β	0,05	0,08	0,13	0,12	0,04	0,06	0,08	0,05	0,07
Grupos OCH ₃	1,17	1,17	0,99	1,07	0,73	0,82	1,03	1,19	1,19
Estruturas β -O-4 sem C α =O	0,24	0,26	0,14	0,17	0,07	0,19	0,24	0,24	0,31
Estruturas β -O-4 com C α =O	0,05	0,04	0,07	0,06	0,06	0,06	0,05	0,06	0,04
Estruturas do tipo álcool coniferílico	0,03	0,02	0,03	0,01	0,02	0,02	0,03	0,02	0,02
Ésteres benzílicos e C γ	0,14	0,07	0,20	0,18	0,09	0,12	0,09	0,09	0,11
Ácido <i>p</i> -cumárico	0,04	0,02	0,01	0,03	0,07	0,16	0,05	0,11	0,04
Ácido ferúlico	0,04	0,01	0,04	0,03	0,07	0,04	0,05	0,06	0,02
C _{Ar} -C	1,52	1,47	1,54	1,52	1,66	1,71	1,60	1,72	1,47
H:G:S	6:47:47	4:48:48	2:58:40	5:55:41	10:63:27	16:47:37	10:46:44	16:37:47	11:35:54

A quantificação das ligações do tipo $\beta\beta$ e $\beta\text{-}5$ (Tabela 4.49) nas lenhinas **LD_{SEA}** e **LD_{CEA}** demonstra que ocorre um ligeiro acréscimo no seu teor nas lenhinas isoladas a partir do material sujeito à pré-extracção alcalina, com excepção dos limbos, em que há um ligeiro decréscimo. De entre as partes morfológicas em estudo, a lenhina dos limbos é a que apresenta teor superior em estruturas $\beta\beta$ e $\beta\text{-}5$.

A abundância de estruturas do tipo $\beta\text{-}O\text{-}4$ sem grupo carbonilo na posição α da cadeia lateral aumentou ligeiramente nas lenhinas **LD_{CEA}** comparativamente às lenhinas **LD_{SEA}** (Tabela 4.50), sendo o seu teor mais elevado nas lenhinas das nervuras/pecíolos e do ráquis.

Da comparação das intensidades dos sinais a 152,2 ppm (C3 e C5 em unidades S eterificadas) e 149,0-149,5 ppm (C3 em unidades G eterificadas) [277] nos espectros das lenhinas SEA e CEA (Figuras 4.53 e 4.54), verifica-se que em todas as partes morfológicas as unidades S encontram-se maioritariamente eterificadas, principalmente nas bainhas foliares e ráquis (razões 7:1 e 9:1, respectivamente), enquanto que as unidades G encontram-se maioritariamente não-eterificadas. No caso da lenhina **LD_{SEA_TF}**, verifica-se uma razão S_e/G_e mais baixa (2:1), o que indica que o teor de unidades G eterificadas é superior relativamente às restantes partes morfológicas.

Relativamente ao teor de unidades de ácido *p*-cumárico, as lenhinas das bainhas foliares e do ráquis são as que apresentam maior abundância deste tipo de estruturas (Tabela 4.49), o que vai ao encontro do observado na espectroscopia de RMN de ^{13}C de estado sólido. É de referir ainda que, tal como observado na análise por permanganato, o teor em estruturas de ácido *p*-cumárico é significativamente menor nas lenhinas **LD_{CEA}**. Dada a maior intensidade do sinal a 159 ppm relativamente ao de 160 ppm, as estruturas de ácido *p*-cumárico nas lenhinas **LD_{SEA}** e **LD_{CEA}** são principalmente unidades fenólicas terminais, devendo-se encontrar maioritariamente na forma eterificada com outras subestruturas de lenhina. Contudo, atendendo à quantidade de estruturas benzil e γ -éster existentes nas diversas lenhinas, constata-se que as estruturas dos ácidos hidrocínâmicos não são as únicas que se encontram unidas por ligações éster à lenhina. Este facto é mais relevante no caso das lenhinas das nervuras/pecíolos e limbos, em que a quantidade das estruturas benzil e γ -éster é cerca de 50-75% superior ao integral dos sinais a 167-168 ppm (C γ em *p*-cumaratos e ferulatos eterificados). Observações idênticas foram obtidas com as lenhinas isoladas pelo método de acidólise com renovação de solvente.

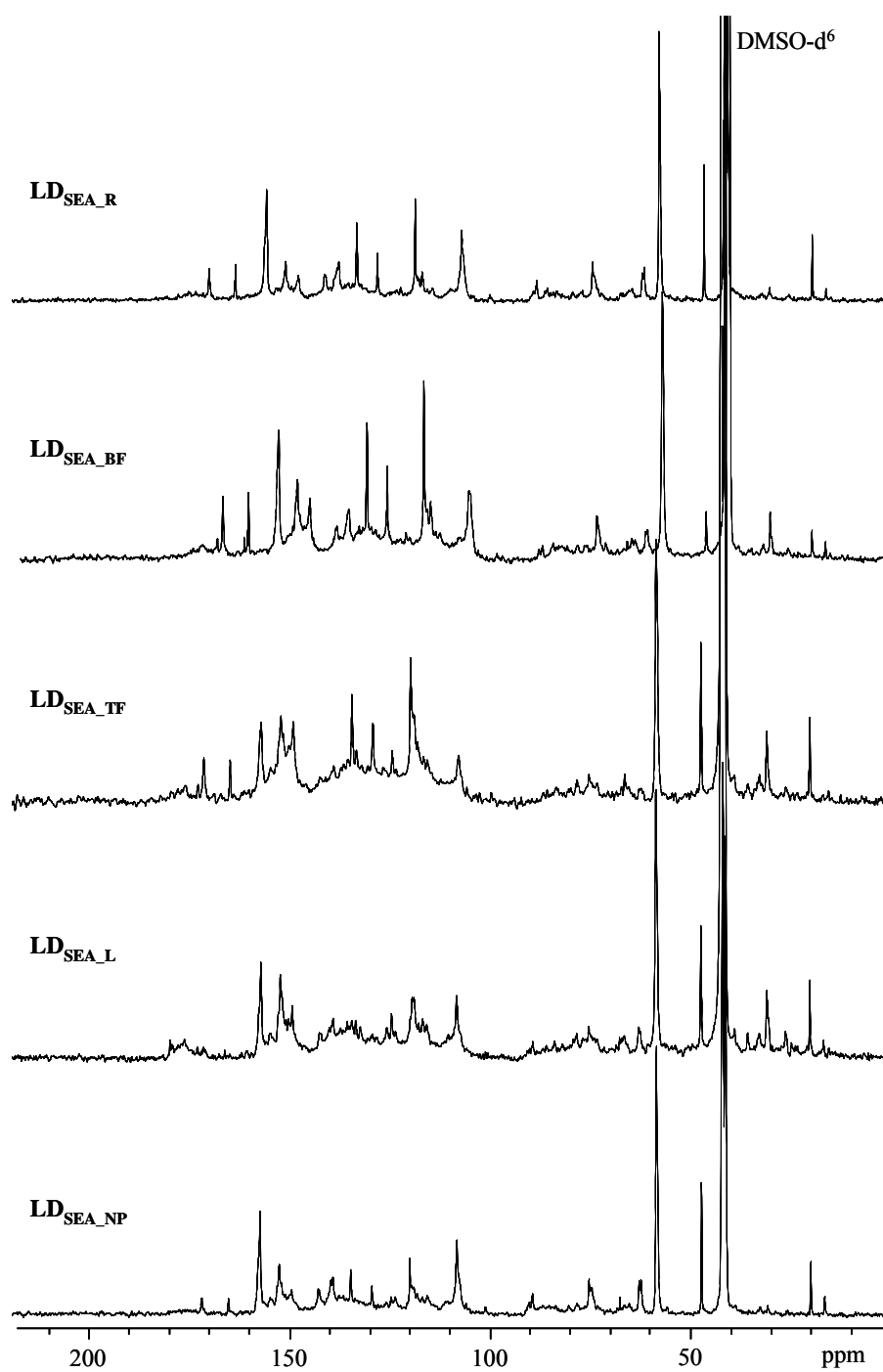


Figura 4.53. Espectros de RMN de ^{13}C quantitativo das lenhinas dioxano LD_{SEA} .

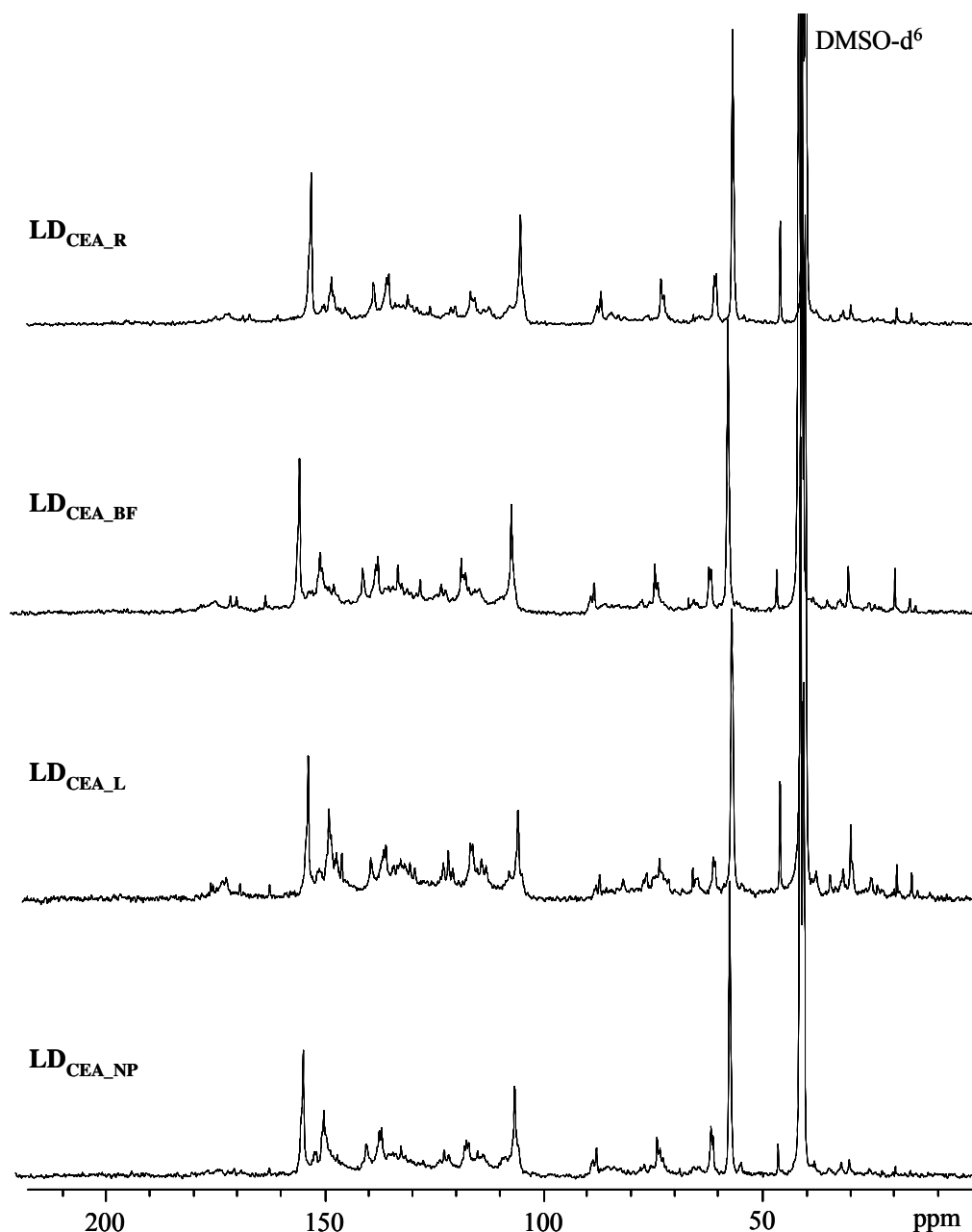


Figura 4.54. Espectros de RMN de ^{13}C quantitativo das lenhinas dioxano LD_{CEA} .

No que diz respeito à quantidade total de ligações C-C_{Ar} , contrariamente ao que é verificado com as lenhinas *in situ* e com a oxidação com permanganato, as lenhinas LD_{CEA} apresentam-se de uma forma geral ligeiramente menos condensadas que as homólogas LD_{SEA} . Esta observação parece indicar que a pré-extracção alcalina influencia o grau de condensação das lenhinas isoladas. A discrepância verificada entre o RMN de ^{13}C e a oxidação com permanganato é uma vez mais explicada pela presença de um elevado teor

de unidades G fenólicas nas lenhinas em estudo, que como referido, encontram-se envolvidas com maior frequência em estruturas condensadas e, por isso mais facilmente analisadas pela oxidação com permanganato.

Comparando as lenhinas **LD_e** e **LD_{CEA}** verifica-se que as lenhinas obtidas pelo método de acidólise modificado apresentam um teor superior de grupos metoxilo, explicado pelo teor superior de unidades S que possuem, de estruturas β -O-4 sem grupo C α =O e um grau de condensação inferior às correspondentes **LD_{CEA}**. Deste modo, confirma-se que o método de acidólise modificado, quando aplicado à ‘Dwarf Cavendish’, tal como verificado nas madeiras [162,267], origina lenhinas menos condensadas.

Espectroscopia de RMN de ¹H

Os resultados da análise estrutural das lenhinas **LD_{SEA}** e **LD_{CEA}** por RMN de ¹H corroboram os obtidos por RMN de ¹³C. Nas Figuras 4.55 e 4.56 apresentam-se os espectros de RMN de ¹H das lenhinas **LD_{SEA}** e **LD_{CEA}**, e na Tabela 4.50 a quantificação das estruturas e ligações químicas em número de grupos/estruturas por unidade fenilpropano.

Tabela 4.50. Frequência de elementos estruturais por anel aromático C₉, obtida por RMN de ¹H das dioxano **LD_{SEA}** e **LD_{CEA}**.

Elemento Estrutural	δ (ppm)	Número de grupo ou estrutura/C ₉									
		LD _{NP}		LD _L		LD _{TF}		LD _{BF}		LD _R	
		SEA	CEA	SEA	CEA	SEA	CEA	SEA	CEA	SEA	CEA
-CH ₂ - e -CH ₃	0,7-1,5	0,49	1,72	2,22	2,25	1,33	5,02	1,12	1,44	0,56	1,06
H β em estruturas β - β	3,0-3,15	n.d.	0,03	n.i.	0,04	0,02	0,13	n.i.	0,07	n.i.	0,07
α -O-4 cíclicas/não cíclicas	5,2-5,7	0,01	0,02	0,07	0,04	0,02	0,03	0,04	0,01	0,05	0,02
H α em estruturas β -O-4 sem C α =O	5,9-6,2	0,22	0,27	0,12	0,18	0,08	0,11	0,18	0,25	0,23	0,29
H aromático	6,2-8,0	3,82	3,48	3,39	2,39	2,14	2,69	3,48	2,8	3,61	2,42

n.d. – não detectado

n.i. – não integrado devido à sobreposição de sinais

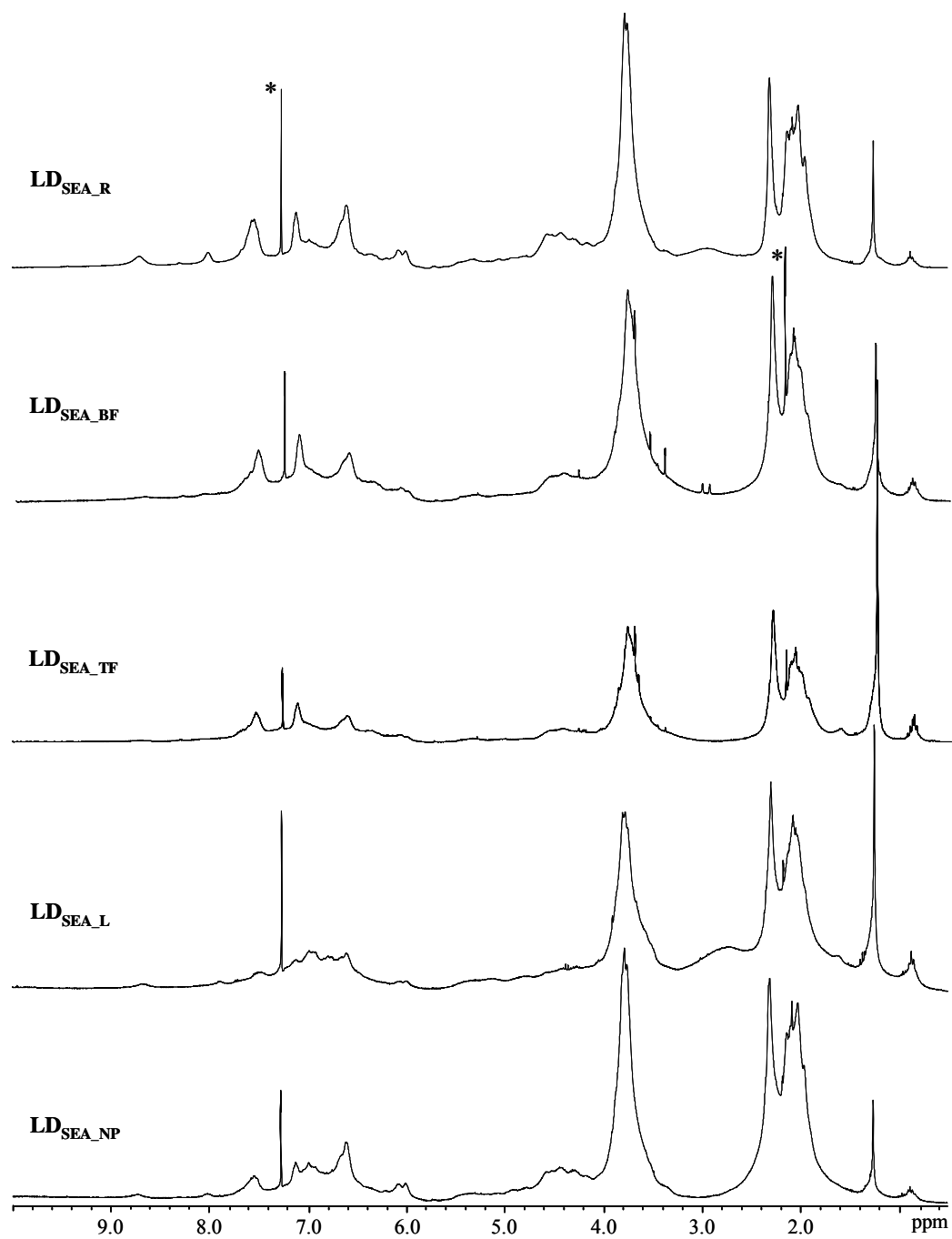


Figura 4.55. Espectros de RMN de ^1H das lenhinas LD_{SEA} acetiladas. $^*\text{CHCl}_3$

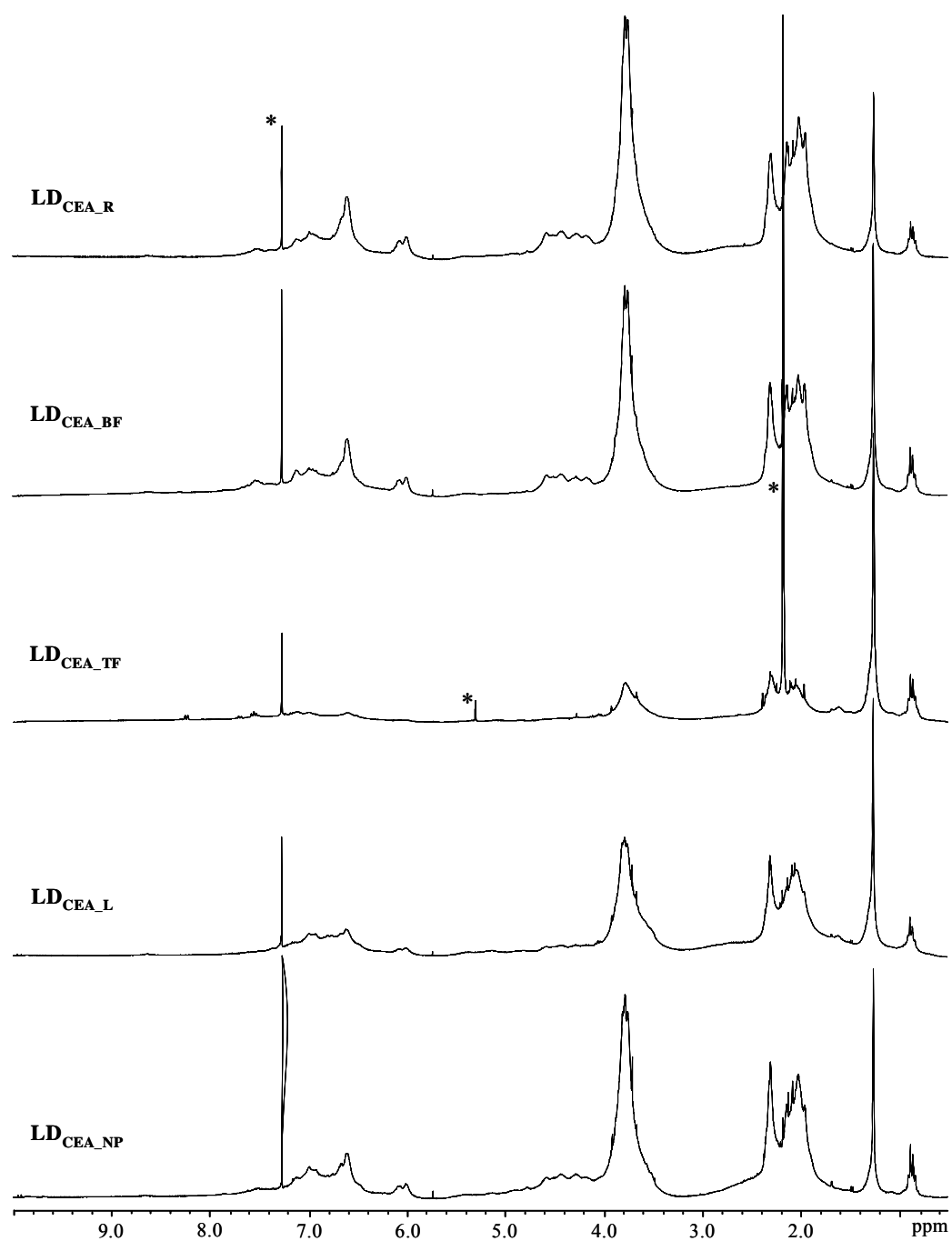


Figura 4.56. Espectros de RMN de ^1H das lenhinas dioxano LD_{CEA} acetiladas. $^*\text{CHCl}_3$

O teor de estruturas alifáticas saturadas, calculadas a partir do integral da região δ_H 1,1-1,5 ppm nos espectros de RMN de 1H indica que as lenhinas **LD_{CEA}** contêm quantidades superiores de grupos $-CH_2-$ e $-CH_3-$ alifáticos, o que confirma o observado por FTIR e RMN CP/MAS de ^{13}C . Tal como verificado na análise dos resultados obtidos por RMN de ^{13}C , o teor de ligações $\beta-O-4$ é ligeiramente superior nas lenhinas **LD_{CEA}**, sendo mais abundantes nas lenhinas das nervuras/pecíolos e ráquis.

Apesar da espectroscopia de RMN de ^{13}C sugerir que as lenhinas **LD_{CEA}** são menos condensadas, a maioria das lenhinas **LD_{CEA}**, com excepção da lenhina do talo floral, apresenta um teor de prótons aromáticos ligeiramente inferior às lenhinas **LD_{SEA}**. Este facto pode ser explicado atendendo à abundância relativa dos três tipos de unidades estruturais (H, G e S). Como referido anteriormente, dado que o sinal a cerca de 7,4-7,6 ppm é atribuído aos prótons aromáticos H2/H6 e H α em estruturas do tipo ácido hidroxicinâmico, a diminuição no teor de prótons aromáticos está também relacionado com a extracção de estruturas do tipo ácido *p*-cumárico durante a pré-extracção alcalina do material, tal como verificado por análise por permanganato e RMN de ^{13}C . O decréscimo deste tipo de unidades é também facilmente observável por comparação dos espectros de RMN de 1H (Figuras 4.55 e 4.56) das lenhinas **LD_{SEA}** e **LD_{CEA}**. No caso da lenhina do talo floral o aumento verificado no teor de prótons aromáticos poderá estar relacionado com o teor em unidades S, as quais com excepção do talo floral, aumentaram das lenhinas **LD_{SEA}** para as **LD_{CEA}** (Tabela 4.50). Da análise por permanganato da lenhina **LD_{CEA}** do talo floral, pode-se afirmar que, apesar do decréscimo verificado no teor de unidades H, os teores inferiores de unidades S e de unidades condensadas relativamente à homóloga **LD_{SEA}**, poderão ser determinantes para o aumento do teor de prótons aromáticos na lenhina em causa.

4.4.4. CONCLUSÃO

Com o objectivo de caracterizar estruturalmente as lenhinas das várias partes morfológicas da bananeira, foram estudados vários parâmetros de forma a otimizar o processo de isolamento e assim obter uma lenhina representativa da lenhina *in situ*.

O estudo foi iniciado com o isolamento das lenhinas pelo método de Björkman. Atendendo aos baixos rendimentos e à elevada extensão de contaminação das lenhinas de Björkman, por parte de extractáveis e hidratos de carbono, conclui-se que este método, para o caso da ‘Dwarf Cavendish’, não é o mais apropriado para a obtenção de uma lenhina adequada a uma caracterização estrutural posterior.

Com base em todos os estudos efectuados, pode-se dizer que, as lenhinas das várias partes morfológicas são do tipo HGS, apresentando, no entanto, algumas diferenças estruturais entre si. A lenhina do ráquis destaca-se pela proporção superior em unidades do tipo S, enquanto que as lenhinas dos limbos e do talo floral possuem como unidades maioritárias as G. As nervuras/pecíolos e bainhas foliares possuem proporções idênticas de unidades G e S. As unidades H são mais abundantes nas lenhinas do talo floral, bainhas foliares e ráquis. As lenhinas das nervuras/pecíolos e ráquis possuem as mais altas proporções de estruturas não condensadas com grupo hidroxilo livre. Por outro lado, a abundância de estruturas do tipo β -O-4 é significativamente inferior nas lenhinas dos limbos e talo floral, comparativamente às restantes fracções. O peso molecular médio ponderado das lenhinas difere significativamente entre as partes morfológicas e consoante o método de extracção, sendo as das nervuras/pecíolos as que apresentam, em geral, valores de \overline{M}_w mais baixos.

As lenhinas em estudo, em termos gerais, apresentam as unidades S maioritariamente eterificadas, contribuindo para fragmentos moleculares lineares, enquanto que as unidades G são maioritariamente não-eterificadas e frequentemente envolvidas em ligações carbono-carbono, sendo representativas das unidades de lenhina com um grupo fenólico livre. Paralelamente às unidades do tipo H, G e S, as várias lenhinas apresentaram na sua constituição ácidos hidroxicinâmicos os quais são constituintes típicos das lenhinas das plantas monocotiledóneas. As estruturas de ácido *p*-cumárico nas lenhinas, que se encontram em maior abundância no talo floral, bainhas foliares e ráquis, são principalmente unidades fenólicas terminais, encontrando-se uma parte significativa deste

tipo de estruturas unidas por ligações éster a outras subestruturas da lenhina. Tendo em conta a quantidade total de *p*-cumaratos e ferulatos e que a maioria das estruturas de ácido *p*-cumárico são unidades fenólicas terminais, a maioria das unidades de ácido ferúlico dever-se-ão encontrar envolvidas em ligações éter. Paralelamente, a presença das ressonâncias atribuídas ao C α em ésteres benzílicos de estruturas β -O-4 e C γ em estruturas β -O-4 γ -esterificadas nas várias lenhinas, indica que as estruturas do tipo ácido hidroxicinâmico não são as únicas que se encontram unidas à lenhina por ligações éster. É de referir que, apesar da remoção da maioria dos compostos alifáticos durante o processo de purificação, uma parte permaneceu nas lenhinas purificadas, o que indica que uma fracção desses componentes se encontra covalentemente ligada à lenhina. A detecção de unidades G e S no extracto em clorofórmio, leva a crer que os compostos alifáticos poderão estar ligados à lenhina através deste tipo de unidades. Esta fracção alifática é mais significativa nas lenhinas dos limbos e no talo floral.

Em termos do processo de purificação, verifica-se que independentemente do método utilizado, as lenhinas obtidas são mais puras, sendo consequentemente um passo fundamental na caracterização estrutural das lenhinas da planta em estudo. Embora ambos os métodos de purificação produzam uma lenhina representativa da lenhina extraída, o método com o 1,2-dicloroetano/etanol (2/1, v/v) revela ser o mais adequado na extracção de compostos alifáticos.

Apesar do método de purificação envolvendo o 1,4-dioxano/metanol seguido de uma extracção das lenhinas com clorofórmio ser também eficaz na remoção dos compostos alifáticos, dada a sua simplicidade e eficácia na remoção de contaminantes, o método que utiliza o 1,2-dicloroetano/etanol deverá ser o adoptado para a purificação das lenhinas da ‘Dwarf Cavendish’.

De entre os compostos alifáticos co-extraídos com a lenhina destacam-se: *i*) os pertencentes à família dos ácidos gordos (saturados, insaturados, hidroxiácidos, ácidos dicarboxílicos), a qual constitui a fracção maioritária, *ii*) ácidos hidroxicinâmicos, nomeadamente os ácidos *p*-cumárico e ferúlico e *iii*) compostos aromáticos derivados da lenhina. De entre os ácidos gordos destacam-se os ácidos 2-hidroxitetraacosanóico, 24-hidroxitetraacosanóico, 26-hidroxihexacosanóico e o 28-hidroxiocetacosanóico. Os ácidos gordos juntamente com os ácidos *p*-cumárico e ferúlico podem derivar de estruturas do

tipo cutina/suberina, as quais poderão ter sido extraídas durante o processo de isolamento da lenhina.

Após os processos de purificação, as lenhinas resultantes apresentaram ainda compostos alifáticos. Isto sugere que as lenhinas das várias partes morfológicas, em particular das bainhas foliares e do talo floral, dever-se-ão encontrar ligadas quimicamente nos tecidos celulares, provavelmente por ligações éster via resíduos ácidos hidroxicinâmicos, a componentes do tipo cutina/suberina. Contudo, a esterificação directa da lenhina com estruturas do tipo cutina/suberina não pode ser totalmente excluída, como indicado pelo balanço de ligações éster nas referidas lenhinas.

No que se refere à pré-extracção alcalina esta revelou-se eficaz na redução de taninos contaminantes, em particular para a lenhina dos limbos e do talo floral. As lenhinas isoladas a partir do material sujeito a pré-extracção alcalina apresentaram comparativamente às lenhinas sem pré-extracção alcalina: *i*) um baixo teor em hidratos de carbono, *ii*) quantidades ligeiramente superiores de substâncias alifáticas, *iii*) maior heterogeneidade, o que se traduz em lenhinas com fragmentos de maior \overline{M}_w , *iv*) teores mais baixos de unidades H e na maioria dos casos teores superiores de unidades G e S, *v*) teores mais baixos de ácidos hidroxicinâmicos (ácidos *p*-cumárico e ferúlico), *vi*) teor relativamente mais baixo de unidades estruturais com o grupo hidroxilo fenólico livre envolvidas em ligações β -5, β -6 e α -6 assim como de estruturas do tipo bifenilo, *vii*) um ligeiro acréscimo na quantidade das estruturas do tipo β -O-4 com $C\alpha=O$, β -O-4 sem $C\alpha=O$ e β - β e β -5 e *viii*) um menor grau de condensação.

Para o método com renovação de solvente as lenhinas **LD_e** apresentaram de uma forma geral algumas diferenças, das quais se destacam: *i*) maior heterogeneidade das lenhinas, assim como valores superiores de \overline{M}_w , *ii*) teores inferiores de unidades H e superiores de unidades S e *iii*) teor superior de estruturas β -O-4 com $C\alpha=O$.

Tendo em conta que os ácidos hidroxicinâmicos constituem pontos de ligação no cruzamento entre a lenhina e os polissacarídeos e/ou cutina/suberina, não sendo deste modo uma parte integrante da lenhina, com os resultados apresentados anteriormente verifica-se que o método de isolamento mais apropriado é o método de acidólise com renovação de solvente submetido ao material com pré-extracção alcalina. Assim, obtém-se

uma lenhina sem taninos, menos contaminada por ácidos hidroxicinâmicos, menos condensada e com um teor superior em unidades S.

As diferenças estruturais verificadas entre as lenhinas permitem justificar uma previsível diferença de reactividade entre as várias zonas morfológicas quando sujeitas a processos alcalinos de deslenhificação. Atendendo a que, uma dada espécie é tanto mais reactiva quanto menor for o grau de condensação da lenhina e maior o seu teor em unidades S e em estruturas β -O-4, é de prever uma maior reactividade para as nervuras/pecíolos, as bainhas foliares e o ráquis. Por outro lado, a maior abundância de estruturas condensadas e de unidades G e o baixo teor em estruturas β -O-4 na lenhina do talo floral, leva a crer que esta parte morfológica terá uma menor resposta no processo de deslenhificação comparativamente com as outras fracções, proporcionando a formação de estruturas condensadas durante o processo de deslenhificação que não conduzem à eliminação da lenhina, mas sim à sua permanência na pasta como lenhina residual.

Dada a grande influência que a lenhina exerce nas propriedades da pasta e papel, a utilização da ‘Dwarf Cavendish’ nesta área requer uma maior atenção, de forma a minimizar os problemas a eles associados. Para tal, em estudos futuros, a avaliação do comportamento da lenhina durante a produção de pasta e papel torna-se importante nomeadamente durante as etapas de cozimento e branqueamento.

5. CONCLUSÃO

As várias partes morfológicas da bananeira ‘Dwarf Cavendish’ apresentam diferenças em termos de **composição química**. O constituinte maioritário das diversas partes morfológicas é a holocelulose (32-63%) com excepção do talo floral que apresenta como componente maioritário o amido (26%). De entre as partes morfológicas com teor superior em celulose destacam-se as bainhas foliares, as nervuras/pecíolos e o ráquis. Relativamente aos outros componentes, destacam-se os elevados teores de cinzas (11-27%) e de extractáveis (5-15%), em particular no talo floral e no ráquis. Na maioria das partes em estudo, os extractáveis em água representam cerca de 59-75% do total dos extractáveis. Os limbos é a parte morfológica que apresenta um teor superior em extractáveis de menor polaridade (*ca.* 63%). O teor de proteínas e de lenhina é superior nos limbos, contrastando com as restantes fracções.

As **hemiceluloses**, que representam cerca de 6-22%, são constituídas maioritariamente por xilose, que compreende cerca de 30 a 78% dos hidratos de carbono totais, glucose e arabinose. As diferentes proporções relativas dos vários monossacarídeos constituintes das hemiceluloses das várias regiões morfológicas, indicam que as hemiceluloses isoladas apresentam estruturas distintas. A análise por RMN de ^1H denuncia a presença de ácido 4-*O*-metil- α -D-glucurónico nas hemiceluloses A, o que sugere a existência de ácidos urónicos, em particular nas nervuras/pecíolos, nos limbos e no ráquis. A presença maioritária de xilose e arabinose nas hemiceluloses A, juntamente com o ácido 4-*O*-metil- α -D-glucurónico, leva a crer que são constituídas essencialmente por glucuronoxilanas e arabinoglucuronoxilanas. Na maioria das regiões morfológicas, a xilose e a glucose são os monossacarídeos maioritários das hemiceluloses B, indicando a presença de xiloglucanas, α -arabinanas e de arabinoxiloglucanas.

Apesar do elevado teor de cinzas e extractáveis, que leva a que seja necessário efectuar uma optimização do processo de cozimento, os elevados teores de holocelulose e baixos de lenhina, assim como o valor da razão entre as hemiceluloses e as celuloses, apresentados pelas nervuras/pecíolos, bainhas foliares e o ráquis, são promissores quanto à utilização deste material na produção de pastas.

Os **extractáveis lipofílicos**, que representam cerca de 1-5%, são constituídos maioritariamente por ácidos gordos e esteróis, seguidos dos álcoois alifáticos e compostos aromáticos. Alguns destes compostos foram identificados em ambas as formas livre e esterificada assim como na forma de glicosídeos. De entre os ácidos gordos destacam-se: *i*) os ácidos saturados, tais como os ácidos hexadecanóico, octadecanóico e tetracosanóico, *ii*) os ácidos insaturados, em particular os ácidos linoleico e linolénico e *iii*) os ω e α -hidroxiácidos, nomeadamente os ácidos 22-hidroxicocanóico, 24-hidroxitetracosanóico, 6-hidroxihexacosanóico, 2-hidroxiicocanóico e 2-hidroxitetracosanóico. Juntamente com os esteróis mais abundantes, β -sitosterol, campesterol e estigmasterol, os respectivos glicosídeos de esterilo, o 3- β -D-glucopiranosídeo de sitosterilo, campesterilo e estigmasterilo foram detectados em grandes quantidades em todas as fracções. Os álcoois alifáticos mais abundantes são os que possuem uma cadeia carbonada superior a 20 átomos de carbono, como é o caso do 1-octacosanol e 1-triacontanol. Os compostos aromáticos presentes em maior quantidade são os ácidos *p*-cumárico e ferúlico.

Embora o aumento significativo no teor de componentes lipofílicos livres, após a hidrólise alcalina, sugira que uma grande fracção destes compostos está envolvida em ligações do tipo éster, a quantidade de compostos esterificados presente nas várias regiões morfológicas não justifica, por si só, o aumento verificado. Apesar da forma como estes compostos estão esterificados seja desconhecida, uma possível explicação é a existência de ligações éster com estruturas de elevado peso molecular como é o caso da suberina e/ou da cutina, não detectáveis por GC-MS.

A grande quantidade de extractáveis lipofílicos nas diferentes partes morfológicas da ‘Dwarf Cavendish’, nomeadamente de ácidos gordos e esteróis, pode constituir um obstáculo à sua utilização industrial na produção de pasta e papel. Para além da influência que exercem na qualidade e propriedades da pasta branqueada, devido à acumulação de extractáveis há também um maior consumo de reagentes durante o processo de branqueamento, reduzindo por conseguinte a branqueabilidade da pasta. Além disso, os extractáveis, tendem a depositar-se nos equipamentos, provocando bloqueios e encerramento das operações, o que conduz a uma redução na produtividade e a um aumento nos custos da mesma. Outro problema é persistirem nos efluentes resultantes deste tipo de indústria, podendo ter um impacto ambiental negativo quer para a fauna quer

para a flora. Assim, a utilização da bananeira nesta área requer uma maior atenção e alvo de estudo, de forma a minimizar os problemas associados à existência destes compostos.

Por outro lado, as diferentes partes morfológicas da ‘Dwarf Cavendish’ mostraram ser uma fonte rica de produtos químicos, nomeadamente de glucosídeos de esterilo, os quais apresentam propriedades benéficas à saúde. Nesta perspectiva, o isolamento prévio da fracção lipofílica poderá permitir o posterior isolamento da fracção rica em glucosídeos de esterilo, minimizando em simultâneo os eventuais problemas da utilização da ‘Dwarf Cavendish’ como fonte de fibra, contribuindo para a sua valorização de uma forma mais integrada.

As **lenhinas** das várias partes morfológicas da ‘Dwarf Cavendish’ foram isoladas por acidólise suave, método este que demonstrou ser mais adequado para o estudo de caracterização estrutural de lenhinas deste tipo de plantas comparativamente ao método de Björkman, do qual resultaram baixos rendimentos e lenhinas altamente contaminadas por hidratos de carbono e extractáveis.

As lenhinas das várias partes morfológicas são do tipo HGS, com a lenhina do ráquis a apresentar o teor mais elevado de unidades S, os limbos e o talo floral de unidades G e o talo floral, bainhas foliares e ráquis de unidades H. Paralelamente às unidades do tipo H, G e S, as várias lenhinas apresentaram na sua constituição ácidos hidroxicinâmicos, nomeadamente unidades terminais de ácido *p*-cumárico, que se encontram envolvidas maioritariamente em ligações éster quer com a lenhina quer com compostos alifáticos. As lenhinas das nervuras/pecíolos e ráquis possuem as mais altas proporções de estruturas não condensadas com grupo hidroxilo livre. Por outro lado, a abundância de estruturas do tipo β -O-4 é significativamente inferior nas lenhinas dos limbos e talo floral, comparativamente às restantes fracções.

Em termos do processo de purificação, verifica-se que é eficaz, independentemente do método utilizado, sendo o método com o 1,2-dicloroetano/etanol (2/1, v/v) o mais adequado. Apesar da remoção da maioria dos compostos alifáticos durante o processo de purificação, uma parte permanece nas lenhinas purificadas, indicando que uma fracção de alifáticos encontra-se covalentemente ligada à lenhina, por unidades H e S.

A acidólise suave aplicada ao material de partida, com pré-extracção alcalina e com renovação de solvente, é o método de isolamento de lenhina mais apropriado, dada a

obtenção de uma lenhina livre de taninos, menos contaminada por ácidos hidroxycinâmicos, menos condensada e com um teor superior em unidades S.

A análise estrutural das amostras de lenhina, provenientes das diferentes regiões morfológicas da ‘Dwarf Cavendish’, mostra de forma clara a variabilidade estrutural deste componente macromolecular dentro da própria planta. Muitas das diferenças verificadas nas características estruturais das lenhinas estão directamente relacionadas com o grau de lenhificação e com a função fisiológica da respectiva zona morfológica. As lenhinas têm influência nas propriedades físicas e mecânicas dos tecidos em causa, na sua conservação, assim como no seu comportamento tecnológico perante um novo estudo de valorização.

Atendendo às diferenças estruturais apresentadas pelas lenhinas das várias partes morfológicas, é de prever que apresentem reactividades diferentes quando sujeitas a processos alcalinos de deslenhificação. Ao contrário do que sucede com a lenhina do talo floral, o menor grau de condensação, teor superior em unidades S e estruturas do tipo β -O-4 apresentado pelas lenhinas das nervuras/pecíolos, das bainhas foliares e do ráquis, permite prever que estas partes morfológicas deverão apresentar uma maior reactividade durante o processo de deslenhificação.

Desta forma, os resultados deste trabalho demonstram que dada a sua abundância relativamente às restantes partes morfológicas e às propriedades químicas apresentadas, nomeadamente o teor em celulose e a estrutura da lenhina, as bainhas foliares e o ráquis são as partes morfológicas que poderão ser favoráveis à aplicação na produção de pasta e papel. As nervuras/pecíolos apresentam de igual modo uma composição química adequada para estes propósitos, embora a nível industrial a sua separação dos limbos possa representar um problema tecnológico adicional.

Por outro lado, do ponto de vista do aproveitamento global deste recurso natural, os limbos, mostraram ser uma fonte rica de químicos, nomeadamente de glucosídeos de esterilo. Dada a crescente procura no mercado de alimentos funcionais enriquecidos em fitosteróis como complementos em dietas normais, a identificação de novas fontes vegetais abundantes neste tipo de compostos pode ser uma contribuição importante para responder a essa procura, sendo uma forma de valorização deste tipo de plantas.

Paralelamente a estes compostos, e dado o elevado teor em amido no talo floral e de proteínas nos limbos, estas fracções poderão ser incorporadas por exemplo em rações para animais.

Tendo em conta que, o desenvolvimento de novas aplicações da ‘Dwarf Cavendish’, assim como o aperfeiçoamento das já existentes, deverá, entre outros aspectos, ter em conta as características químicas e estruturais dos constituintes da planta, este trabalho teve como objectivo colmatar a lacuna existente nesta área. Só assim poderá haver uma utilização destas espécies de forma mais racional e mais eficiente.

Embora este trabalho tenha contribuído de forma determinante para o aprofundamento do conhecimento da bananeira ‘Dwarf Cavendish’, de forma a acrescentar informação ou esclarecer pontos menos abordados, alguns outros tópicos importantes merecem ser alvo de uma investigação futura, nomeadamente:

- Caracterização da estrutura morfológica das várias partes por microscopia óptica, SEM e porosimetria de mercúrio;
- Estudo da composição dos extractáveis polares das cinco partes morfológicas;
- Caracterização das hemiceluloses de forma mais exhaustiva por análise de ligações, LEX/SEC-ESI/MS/MS;
- Análise estrutural da celulose por difracção de raios x.
- Estudo do comportamento dos extractáveis lipofílicos, dos polissacarídeos e da lenhina durante os processos de cozimento e branqueamento na produção de pastas celulósicas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hammet, A.L., Youngs, R.L., Sun, X. e Chandra, M. 2001. Non-Wood Fiber as an Alternative to Wood Fiber in China's Pulp and Paper Industry. *Holzforschung* **55**, 219-224.
2. Soffner, M.L.A.P. 2001. Produção de Polpa Celulósica a partir de Engaço de Bananeira. Tese de Mestrado, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
3. FAO. FAO Statistical Databases. 24 de Abril 2006.
4. Sharrock, S. e Frison, E. 1999. *Musa* production around the world – trends, varieties and regional importance. *Em: INIBAP annual report 1998*. INIBAP: Montpellier (FRA), p. 42-47.
5. Reddy, N. e Yang, Y. 2005. Biofibers from agricultural byproducts for industrial applications. *Trends Biotechnol.* **23** (1), 22-27.
6. Simmonds, N.W. 1962. Anthocyanins in wild bananas. *Em: The evolution of bananas*. London: Longmans, London, England, p. 23-25.
7. Gouveia, V.H. 1939. *A Banana*. 2ª edição, Tipografia Funchal, Madeira, p. 25-39.
8. Ribeiro, L.N.V.P. 1992. A Cultura da Bananeira (*Musa Acuminata* Colla, AAA) na Região Autónoma da Madeira, Estudo de duas Técnicas Culturais. Trabalho de Fim de Curso de Engenharia Agrícola, Universidade de Évora.
9. Peña, F.J.A. 1981. Cultivo de la Platanera. *Em: Cultivo de la Platanera*, Ministerio de Agricultura, Publications de Extension Agraria, Madrid, Espanha, Cap. 1, p. 17-33.
10. INIBAP-International Network for the Improvement of Banana and Plantain. The many uses of *Musa*. Outubro 2003. Available at URL:
<http://www.unctad.org/infocomm/francais/banane/Doc/uses.pdf#search=%22The%20many%20uses%20of%20musa%22>
11. Kaputo, M.T. 1996. The role of ashes and sodium bicarbonate in a simulated meat product from chikanda tuber (*Satyria siva*). *Food Chem.* **55** (2), 115-119.
12. Satyanarayana, K.G., Sukumaran, K., Kulkarni, A.G., Pillai, S.G.K. e Rohatgi, P.K. 1986. Fabrication and properties of natural fibre-reinforced polyester composites. *Composites* **17** (4), 329-333.
13. Pavithran, C., Mukherjee, P.S., Brahmakumar, M. e Damodaran, A.D. 1987. Impact Properties of Natural Fiber Composites. *J. Mater. Sci. Lett.* **6**, 882-884.
14. Coutts, R.S.P. 1990. Banana fibres as reinforcement for building products. *J. Mater. Sci. Lett.* **9**, 1235-1236.
15. Zhu, W.H. e Tobias, B.C. 1994. Air-Cured Banana-Fibre-Reinforced Cement Composites. *Cem. Concr. Compos.* **16**, 3-8.
16. Zhu, W.H., Tobias, B.C. e Coutts, R.S.P. 1995. Banana fibre strands reinforced polyester composites. *J. Mater. Sci. Lett.* **14**, 508-510.
17. Pothan, L.A., Thomas, S. e Neelakantan, N.R. 1997. Short Banana Fiber Reinforced Polyester Composites: Mechanical, failure and Aging Characteristics. *Reinf. Plast. Compos.* **16** (8), 741-765.
18. Savastano Jr., H., Warden, P.G. e Coutts, R.S.P. 2000. Brazilian waste fibres as reinforcement for cement-based composites. *Cem. Concr. Compos.* **22**, 379-384.
19. Pothan, L.A. e Thomas, S. 2003. Dynamic Mechanical Analysis of Banana Fiber Reinforced Polyester Composites. *Compos. Sci. Technol.* **63**, 1231-1240.
20. Savastano Jr., H., Warden, P.G. e Coutts, R.S.P. 2003. Potential of alternative fibre-cements as building materials for developing areas. *Cem. Concr. Compos.* **25**, 585-592.

21. Cordeiro, N., Belgacem, M.N., Torres, I.C. e Moura, J.V.C.P. 2004. Chemical composition and pulping of banana pseudo-stems. *Ind. Crops Prod.* **19**, 147-154.
22. Cordeiro, N., Oliveira, L., Belgacem, M.N., Faria H. e Moura, J.V.C.P. 2006. Surface Modification of Banana-Based Lignocellulose Fibres. *Em: K.L. Mittal (ed.), Contact Angle, Wettability and Adhesion, VSP, The Netherlands, Vol. 4, p. 1-19.*
23. Cordeiro N., Belgacem M.N., Chaussy D. e Moura J.C.V.P. 2005. Pulp and Paper from ‘Dwarf Cavendish’ Pseudo-stems. *Cell. Chem. Technol.* **39**, 517-529.
24. Ankrah, E.K. 1974. Chemical Studies of Some Plant wastes from Ghana. *J. Sci. Food Agric.* **25**, 1229-1232.
25. Singh, Y.N. e Dryden, W.F. 1985. Muscle Paralyzing Effect of the Juice from the Trunk of the Banana Tree. *Toxicon* **23** (6), 973-981.
26. Pereira, J.R., Bustos, R.E. e Zyngier, Z. 1963. Some Pharmacological Properties of the Juice of Banana Plant. *Archs. Int. Pharmacodyn. Ther.* **144**, 144-150.
27. Singh, Y.N. e Dryden, W.F. 1990. The Augmentation Action of Banana Tree Juice on Skeletal Muscle Contraction. *Toxicon* **28** (10), 1229-1236.
28. Benítez, M.A., Navarro, E., Fera, M., Trujillo, J. e Boada, J. 1991. Pharmacological Study of the Muscle Paralyzing Activity of the Juice of the Banana Plant. *Toxicon* **29** (4/5), 511-515.
29. Singh, Y.N., Inman, W.D., Johnson, A. e Linnell, E.J. 1993. Studies on the Muscle-Paralyzing Components of the Juice of the Banana Plant. *Arch. Int. Pharmacodyn.* **324**, 105-113.
30. Pazmiño-Durán, E.A., Giusti, M.M., Wrolstad, R.E. e Glória, M.B.A. 2001. Anthocyanins from banana bracts (*Musa X paradisiaca*) as potential food colorants. *Food Chem.* **73**, 327-332.
31. França, R.C.F. 1990. A Cultura da bananeira na ilha da Madeira. *Suplemento Agricultura Regional. Diário de Notícias.* **47493**, 11.
32. Ferreira, B. 1989. A Factura da reconversão. “Dossier” Banana da Madeira. *Jornal da Madeira.* **17483**, 18-22.
33. Sjöström, E. 1981. The Structure of Wood. *Em: Wood Chemistry: Fundamentals and Applications.* Academic Press Inc., New York, USA, Cap. 1, pp. 1-20.
34. Santos, C.C.F. e Falcão, L.A. 1980. Matérias-primas fibrosas utilizadas no fabrico de pastas para papel. Instituto dos Produtos Florestais, Lisboa, p.1-17.
35. Fengel, D. e Wegener, G. 1984. Structure and Ultrastructure. *Em: Wood, Chemistry, Ultrastructure, Reactions,* W. de Gruyter, New York, USA, Cap. 2, p. 6-25.
36. Hopkins, W.G. e Hüner, N.P.A. 2004. Cells, Tissues, and Organs: The Architecture of Plants. *Em: Introduction to Plant Physiology,* Cap. 1, p. 1-28.
37. Wilson, J.R. 1993. Organization of Forage Plant Tissues. *Em: Forage Cell Wall Structure and Digestibility.* Jung, H.G., Buxton, D.R., Hatfield, R.D., Ralph, J. (Eds.), ASA-CSSA-SSSA, Madison, USA, p. 1-32.
38. Roja, M.L.B. e Neves, J.M. 2002. Caracterização de Fibras de Bananeira “Nanicão” (*Musa* Grupo AAA, ‘Giant Cavendish’) como possível Matéria-Prima para produção de Pasta Celulósica para Fabricação de Papel. *Em: Congresso Iberoamericano de Investigación en Celulosa y Papel, Parte A e B,* Campinas, Brasil.
39. Hopkins, W.G. e Hüner, N.P.A. 2004. Energy Conservation in Photosynthesis: Harvesting Sunlight. *Em: Introduction to Plant Physiology,* Cap. 4, p. 63-87.
40. Heredia, A. 2003. Biophysical and biochemical characteristics of cutin, a plant barrier biopolymer. *Biochim. Biophys. Acta* **1620**, 1-7.
41. Kulkarni, A.G., Satyanarayana, K.G. e Rohatgi, P.K. 1983. Mechanical properties of banana fibers. *J. Mater. Sci.* **18**, 2290-2296.

42. Cordeiro, N., Faria, H., Oliveira, L., Belgacem, M.N., Moura, J.C.V.P. e Dufresne, A. 2004. Composite Materials Based on Lignocellulosic Fibres from 'Dwarf Cavendish'. *Em: 7th International Conference on Structural Adhesives in Engineering*, Bristol, England, p. 133-136.
43. Pascoal Neto, C., Seca, A., Nunes, A.M., Coimbra, M.A., Domingues, F., Evtuguin, D., Silvestre, A. e Cavaleiro, J.A.S. 1997. Variations in chemical composition and structure of macromolecular components in different morphological regions and maturity stages of *Arundo donax*. *Ind. Crops and Prod.* **6**, 51-58.
44. Atchison, J.E. 1993. Data on non-wood plant fibers. *Em: Pulp and Paper Manufacture*, Vol. III, Hamilton, H. e Leopold, B. (Eds.), TAPPI Press, Atlanta, USA, p. 157-163.
45. Theander, O. e Westerlund, E. 1993. Quantitative Analysis of Cell Wall Components. *Em: Forage Cell Wall Structure and Digestibility*. Jung, H.G., Buxton, D.R., Hatfield, R.D. e Ralph, J. (Eds.), ASA-CSSA-SSSA, Madison, USA, Cap. 4, p. 247-270.
46. Fengel, D. e Wegener, G. 1984. Chemical Composition and Analysis of Wood. *Em: Wood, Chemistry, Ultrastructure, Reactions*, W. de Gruyter, New York, USA, Cap. 3, p. 26-65.
47. Selema, M.D. e Farago, M.E. 1996. Trace Element Concentrations in the Fruit Peels and Trunks of *Musa paradisiaca*. *Phytochemistry* **42** (6), 1523-1525.
48. Sjöström, E. 1981. Extractives. *Em: Wood Chemistry: Fundamentals and Applications*. Academic Press Inc., New York, USA, Cap. 5, p. 83-97.
49. Fengel, D. e Wegener, G. 1984. Extractives. *Em: Wood, Chemistry, Ultrastructure, Reactions*, W. de Gruyter, New York, USA, Cap. 7, p. 182-226.
50. Hopkins, W.G. e Hüner, N.P.A. 2004. "Secondary Plant Metabolites". *Em: Introduction to Plant Physiology*, Cap. 22, p. 493-513.
51. Ndiege, I.O., Budenberg, W.J., Lwande, W. e Hassanali, A. 1991. Volatile components of banana pseudostem of a cultivar susceptible to the banana weevil. *Phytochemistry* **30** (12), 3929-3930.
52. Ndiege, I.O., Budenberg, W.J., Otieno, D.O. e Hassanali, A. 1996. 1,8-Cineole: An Attractant for the Banana Weevil, *Cosmopolites Sordidus*. *Phytochemistry* **30** (12), 3929-3930.
53. Xu, R., Fazio, G.C. e Matsuda, S.P.T. 2004. On the origins of triterpenoid skeletal diversity. *Phytochemistry* **65**, 261-291.
54. Heupel, R.C. 1989. Isolation and Primary Characterization of Sterols. *Em: Analysis of Sterols and Other Biologically Significant Steroids*. Nes, W.D. e Parish, E.J. (Eds.), Academic Press, San Diego, USA, Cap. 1, p. 1-31.
55. Piironen, V., Lindsay, D.G., Miettinen, T.A., Toivo, J. e Lampi, A.-M. 2000. Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. *J. Sci. Food Agric.* **80**, 939-966.
56. Volin, P. 2001. Analysis of steroidal lipids by gas and liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.* **935**, 125-140.
57. Hakala, P., Lampi, A.-M., Ollilainen, V., Werner, U., Murkovic, M., Wähälä, K., Karkola, S. e Piironen, V. 2002. Steryl Phenolic Acid Esters in Milling Fractions of Cereals. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 5300-5307.
58. Knapp, F.F. e Nicholas, H.J. 1969. The distribution of sterols and steryl esters in the banana plant. *Phytochemistry* **8**, 2091-2093.
59. Knapp, F.F. e Nicholas, H.J. 1969. The sterols and triterpenes of banana peel. *Phytochemistry* **8**, 207-214.
60. Knapp, F.F. e Nicholas, H.J. 1969. The sterols and triterpenes of banana pulp. *J. Food Sci.* **34**, 584-586.
61. Knapp, F.F. e Nicholas, H.J. 1971. The biosynthesis of 31-norcyclolaudenone in *Musa sapientum*. *Phytochemistry* **10**, 97-102.

62. Akihisa, T., Shimizu, N., Tamura, T. e Matsumoto, T. 1986. (24S)-14 α ,24-Dimethyl-9 β ,19-cyclo-5 α -cholest-25-en-3 β -ol, A New Sterol and Other Sterols in *Musa sapientum*. *Lipids* **21**, 494-497.
63. Akihisa, T., Kimura, Y. e Tamura, T. 1998. Cycloartane Triterpenes from the Fruit Peel of *Musa sapientum*. *Phytochemistry* **7**, 1107-1110.
64. Banerji, N., Sen, A.K. e Das, A.K. 1982. A New 9,19-Cyclotriterpene from Flowers of *Musa paradisiaca* (Banana). *Indian J. Chem.* **21B**, 387-388.
65. Dutta, P.K., Das, A.K. e Banerji, N. 1983. A Tetracyclic Triterpenoid from *Musa paradisiaca*. *Phytochemistry* **22**, 2563-2564.
66. Ghosal, S. e Saini, K.S. 1984. Sitoindosides I and II, Two New Anti-ulcerogenic Sterylacylglucosides from *Musa paradisiaca*. *J. Chem. Res. (S)*. 110.
67. Ghosal, S. 1985. Steryl glycosides and acyl steryl glycosides from *Musa paradisiaca*. *Phytochemistry* **24** (8), 1807-1810, 1985.
68. Harborn, J.B. 1994. Phenolics. *Em: Natural Products: Their Chemistry and Biological Significance*. J. Mann, R.S. Davidson, J.B. Hobbs, D.V. Banthorpe e J.B. Harborn (Eds.), Longman Scientific & Technical, England, Cap. 5, p. 361-388.
69. Jung, H.G. e Deetz, D.A. 1993. Cell Wall Lignification and Degradability. *Em: Forage Cell Wall Structure and Digestibility*. Jung, H.G., Buxton, D.R., Hatfield, R.D. e Ralph, J. (Eds.), ASA-CSSA-SSSA, Madison, USA, Cap. 13, p. 315-345.
70. Tapiero, H., Tew, K.D., Nguyen Ba, G. e Mathé, G. 2002. Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies? *Biomed Pharmacother.* **56**, 200-207.
71. Stewart, D. e Morrison, I.M. 1996. Phenolic acid dimmers in barley straw cell walls. *Em: The chemistry and processing of wood and plant fibrous materials*. Kennedy, J.F., Phillips, G.O., Williams, P.A. (Eds.), Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England, Cap. 4, p. 31-36.
72. Browning, B.L. 1967. Phenolic Substances. *Em: Methods of Wood Chemistry, Vol. I*, Interscience Publisher, New York, USA, Cap. 12, p. 223-251.
73. Escribano-Bailón, M.T., Santos-Buelga, C. e Rivas-Gonzalo, J. 2004. Anthocyanins in cereals. *J. Chromatogr. A*. **1054**, 129-141.
74. Ali, M. 1992. Neo-clerodane diterpenoids from *Musa balbisiana* seeds. *Phytochemistry* **31** (6), 2173-2175.
75. Ali, M. e Bhutani, K.K. 1993. Flavan-3,4-diols from *Musa sapientum* seeds. *Pharmazie* **48**, 455-456.
76. Fechtal, M. e Riedl, B. 1991. Analyse des Extraits Tannants des Écorces des *Eucalyptus* après Hydrolyse Acide par la Chromatographie en Phase Gazeuse Couplée avec la Spectrométrie de Masse (GC-MS). *Holzforschung* **45** (4), 269-273.
77. Baijal, M., Singh, S., Shukla, R.N. e Sanwal, G.G. 1972. Enzymes of the Banana Plant: Optimum Conditions for Extraction. *Phytochemistry* **11**, 929-936.
78. Franke, R., Briesen, I., Wojciechowski, T., Faust, A., Yephremov, A., Nawrath, C. e Schreiber, L. 2005. Apoplastic polyesters in *Arabidopsis* surface tissues – A typical suberin and a particular cutin. *Phytochemistry* **66** (22), 2643-2658.
79. Matas, A.J., Cuartero, J.E e Heredia, A. 2004. Phase transitions in the biopolyester cutin isolated from tomato fruit cuticles. *Thermochim. Acta* **409**, 165-168.
80. Eglinton, G e Hunneman, D.H. 1968. Gas Chromatographic-Mass Spectrometric Studies of Long Chain Hydroxy Acids: I. The Constituent Cutin Acids of Apple Cuticle. *Phytochemistry* **7**, 313-322.
81. Kolattukudy, P.E. 1977. Lipid Polymers and associated phenols, their chemistry, biosynthesis, and role in pathogenesis. *Em: The Structure, Biosynthesis and Degradation of Wood*. Loewus, F.A. e Runeckles, V.C. (Eds.). Plenum Press, New York, 185-246.
82. Kolattukudy, P.E. 2002. Cutin from Plants. *Em: Biopolymers. Volume 3a*. Alexand, D.Y. (Ed.), Wiley-VCH, Munster, Germany, p. 1-35.

83. Cordeiro, N., Belgacem, M.N., Silvestre, A.J.D., Pascoal Neto, C. e Gandini, A., 1998. Cork suberin as a new source of chemicals. 1. Isolation and chemical characterization of its components. *Int. J. Biol. Macromol.* **22**, 71-80.
84. Lopes, M.H., Gil, A.M., Silvestre, A.J.D. e Pascoal Neto, C. 2000. Composition of suberin extracted upon gradual alkaline methanolysis of *Quercus suber* L. Cork. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 383-391.
85. Bernards, M.A. 2002. Demystifying suberin. *Can. J. Bot.* **80** (3), 227-240.
86. Freeman, B. e Turner, D.W. 1985. The Epicuticular Waxes on the Organs of Different Varieties of Banana (*Musa* spp.) Differ in Form, Chemistry and Concentration. *Aust. J. Bot.* **33**, 393-408.
87. Sjöström, E. 1981. Fundamentals in Carbohydrate Chemistry. *Em: Wood Chemistry: Fundamentals and Applications*. Academic Press Inc., New York, USA, Cap.2, p. 21-48.
88. Sjöström, E. 1981. Wood Polysaccharides. *Em: Wood Chemistry: Fundamentals and Applications*. Academic Press Inc., New York, USA, Cap. 3, p. 49-67.
89. Fengel, D. e Wegener, G. 1984. "Cellulose". *Em: Wood, Chemistry, Ultrastructure, Reactions*, W. de Gruyter, New York, USA, Cap. 4, p. 66-105.
90. Klemm, D., Philipp, B., Heinze, T. Heinze, U. e Wagenknecht, W. 1998. General Considerations on Structure and Reactivity of Cellulose. *Em: Comprehensive Cellulose Chemistry*, Vol. I: Functionalization of Cellulose, Wiley-VCH, Weinheim, Germany.
91. Okamura, K., 1991. Structure of Cellulose. *Em: Wood and Cellulosic Chemistry*. Hon, D.N.-S. e Shiraishi, N. (Eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, USA, Cap. 4, p. 89-112.
92. Fengel, D. e Wegener, G. 1984. Polyoses (Hemicelluloses). *Em: Wood, Chemistry, Ultrastructure, Reactions*, W. de Gruyter, New York, USA, Cap. 5, p. 106-131.
93. Hatfield, R.D. 1993. Cell Wall Polysaccharide Interactions and degradability. *Em: Forage Cell Wall Structure and Digestibility*. Jung, H.G., Buxton, D.R., Hatfield, R.D. e Ralph, J. (Eds.), ASA-CSSA-SSSA, Madison, USA, Cap. 12, p. 285-313.
94. Vierhuis, E., Schols, H.A., Beldman, G. e Voragen, A.G.J. 2001. Structural characterization of xyloglucan and xylans present in olive fruit (*Olea europaea* cv *koroneiki*). *Carbohydr. Polym.* **44**, 51-62.
95. Tester, R.F., Karkalas, J. e Qi, X. 2004. Starch-composition, fine structure and architecture. *J. Cereal Sci.* **39**, 151-165.
96. Shantha, H.S. e Siddappa, G.S. 1970. Accumulation of Starch in Banana Pseudostem and Fruit. *J. Food Sci.* **35**, 74-77, 1970.
97. Sun, R.C., Fang, J.M., Goodwin, A., Lawther, J.M. e Bolton, A.J. 1998. Fractionation and characterization of polysaccharides from abaca fibre. *Carbohydr. Polym.* **37**, 351-359.
98. Grabber, J.H., Ralph, J. e Hatfield, D. 1998. Ferulate Cross-Links Limit the Enzymatic Degradation of Synthetically Lignified Primary Walls of Maize. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 2609-2614.
99. Grabber, J.H., Ralph, J. e Hatfield, D. 2000. Cross-Linking of Maize Walls by Ferulate Dimerization and Incorporation into Lignin. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 6106-6113.
100. Chesson, A. 1993. Mechanistic Models of Forage Cell Walls. *Em: Forage Cell Wall Structure and Digestibility*. Jung, H.G., Buxton, D.R., Hatfield, R.D. e Ralph, J. (Eds.), ASA-CSSA-SSSA, Madison, USA, Cap. 14, p. 347-376.
101. Puls, J. 1997. Chemistry and biochemistry of hemicelluloses: relationship between hemicellulose structure and enzymes required for hydrolysis. *Macromol. Symp.* **120**, 183-196.
102. Fengel, D. e Wegener, G. 1984. Lignin. *Em: Wood, Chemistry, Ultrastructure, Reactions*, W. de Gruyter, New York, USA, Cap. 6, p. 132-181.
103. Sarkanen, K.V. e Ludwig, C.H. 1971. Definition and Nomenclature. *Em: Lignins Occurrence, Formation, Structure and Reactions*. Sarkanen, K.V. e Ludwig, C.H. (Eds.), Wiley-Interscience, New York, USA, Cap. 1, p. 1-18.

104. Hatfield, R. e Vermerris, W. 2001. Lignin Formation in Plants. The Dilemma of Linkage Specificity. *Plant Physiol.* **126**, 1351-1357.
105. Sjöström, E. 1981. Lignin. *Em: Wood Chemistry: Fundamentals and Applications*. Academic Press Inc., New York, USA, Cap. 4, p. 68-82.
106. Davin, L.B. e Lewis, N.G. 2000. Dirigent proteins and dirigent sites explain the mystery of specificity of radical precursor coupling in lignan and lignin biosynthesis. *Plant Physiol.* **123**, 453-461.
107. Dence, C.W., Lin, S.Y. 1992. Introduction. *Em: Methods in Lignin Chemistry*. Lin, S.Y e Dence C.W. (Eds.), Springer-Verlag, Berlin, Germany, Cap. 1, p.1-17.
108. Pan, G.X., Bolton, J.L. e Leary, G.J. 1998. Determination of Ferulic and *p*-Coumaric Acids in Wheat Straw and the Amounts Released by Mild Acid and Alkaline Peroxide Treatment. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 5283-5288.
109. Ralph, J., Hatfield, R.D., Quideau, S., Helm, R.F., Grabber, J.H. e Jung, H.-J.G. 1994. Pathway of *p*-coumaric acid incorporation into maize lignin as revealed by NMR. *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 9448-9456.
110. Lu, F. e Ralph, J. 1999. Detection and Determination of *p*-Coumarylated Units in Lignins. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 1988-1992.
111. Crestini, C. e Argyropoulos, D.S. 1997. Structural analysis of wheat straw lignin by quantitative ³¹P and 2D NMR spectroscopy. The occurrence of ester bonds and α -O-4 substructures. *J. Agric. Food Chem.* **45**, 1212-1219.
112. Terashima, N. e Fukushima, K. 1993. Comprehensive Model of the Lignified Plant Cell Wall. *Em: Forage Cell Wall Structure and Digestibility*. Jung, H.G., Buxton, D.R., Hatfield, R.D. e Ralph, J. (Eds.), ASA-CSSA-SSSA, Madison, USA, Cap.10, p. 247-270.
113. Terashima, N., Atalla, R.H. e Vanderharts, D.L. 1997. Solid State NMR Spectroscopy of Specifically ¹²C-Enriched Lignin in Wheat Straw from Coniferin. *Phytochemistry* **46** (5), 863-870.
114. Fry, S.C e Miller, J.G. 1989. Toward a working model of the growing plant cell wall: Phenolic cross-linking reactions in the primary cell walls of dicotyledons. *Em: Plant cell wall polymers: Biogenesis and biodegradation*. Lewis, N.G e Paice, M.G. (Eds.), Am. Chem. Soc., Washington, DC, p. 33-46.
115. Hartley, R.D. 1972. *p*-Coumaric and ferulic acid components of cell walls of ryegrass and their relationships with lignin and digestibility. *J. Sci. Food Agric.* **23**, 1347-1354.
116. Ralph, J., Grabber, J.H. e Hatfield, R.D. 1995. Lignin-Ferulate Cross-Links in Grasses - Active Incorporation of Ferulate Polysaccharide Esters into Ryegrass Lignins. *Carbohydr. Res.* **275** (1), 167-178.
117. Hartley, R.D., Morrison, W.H., Himmelsbach, D.S. e Borneman, W.S. 1990. Cross-linking of cell wall phenolic arabinoxylans in graminaceous plants. *Phytochemistry* **29**, 3705-3709.
118. Morrison, T.A., Jung, H.G., Buxton, D.R. e Hatfield, R.D. 1998. Cell wall composition of maize internodes of varying maturity. *Crop Sci.* **38**, 455-460.
119. Sun, R.C., Fang, J.M., Goodwin, A., Lawther, J.M. e Bolton, A.J. 1998. Physico-Chemical and Structural Characterization of Alkali Lignins from abaca fibre. *J. Wood Chem. Technol.* **18** (3), 313-331.
120. Sun, R.C., Fang, J.M., Goodwin, A., Lawther, J.M. e Bolton, A.J. 1999. Fractionation and characterization of ball-milled and enzyme lignins from abaca fibre. *J. Sci. Food Agric.* **79**, 1091-1098.
121. Cordeiro, N., Belgacem, M.N., Torres, I.C. e Moura, V.P. 2003. Pulps and Papers from Banana Pseudo-Stems. *Em: 28th EUCEPA Conference*, Lisboa, Portugal, p. 333-334.
122. Faria, H., Cordeiro, N., Belgacem, M.N. e Dufresne, A. 2006. 'Dwarf Cavendish' as a source of natural fibers in polypropylene-based composites. *Macromol. Mater. Eng.* **291**, 16-26.

123. Mishra, S. e Naik, J.B. 1998. Absorption of Steam and water at Ambient Temperature in Wood Polymer Composites Prepared from Agro-Waste and Novolac. *J. Appl. Polym. Sci.* **68**, 1417-1421.
124. Mishra, S., Naik, J.B. e Patil, Y.P. 2000. Absorption of Water at Ambient Temperature and Steam in Wood-Polymer Composites Prepared from Agrowaste and Polystyrene. *Compos. Sci. Technol.* **60**, 1729-1735.
125. Mishra, S., Naik, J.B. e Patil, Y.P. 2004. Studies on Swelling Properties of Wood/Polymer Composites Based on Agro-Waste and Novolac. *Adv. Polym. Tech.* **23** (1), 46-50.
126. Gañán, P., Cruz, J., Garbizu, S., Arbelaiz, A. e Mondragon, I. 2004. Stem and Bunch Banana Fibers from Cultivation Wastes: Effect of Treatments on Physico-Chemical Behaviour. *J. Appl. Polym. Sci.* **94**, 1489-1495.
127. Pothan, L.A. e Thomas, S. 2004. Effect of Hybridization and Chemical Modification on the Water-Absorption Behaviour of Banana Fiber-Reinforced Polyester Composites. *J. Appl. Polym. Sci.* **91**, 3856-3865.
128. Lambert, J.B., Shurvell, H.F., Lightner, D.A. e Cooks, R.G. 1998. Introduction and Experimental Methods. *Em: Organic Structural Spectroscopy*, Prentice Hall, New Jersey, Cap. 7, p. 152-174.
129. Conklin-Brittain, N.L., Dierenfeld, E.S., Wrangham, R.H., Norconk, M. e Silver, S.C. 1999. Chemical Protein Analysis: A Comparison of Kjeldahl Crude Protein and Total Ninhydrin Protein from Wild, Tropical Vegetation. *J. Chem. Ecol.* **24** (12), 2601-2622.
130. Yeoh, H.H. e Wee, Y.C. 1994. Leaf Protein Contents and Nitrogen-to-Protein Conversion Factors for 90 Plant-Species. *Food Chem.* **49** (3), 245-250.
131. Browning, B.L. 1967. Determination of Lignin. *Em: Methods of Wood Chemistry*, Vol. II, Interscience Publisher, New York, USA, Cap. 34, p. 785-822.
132. Yasuda, S. e Murase, N. 1995. Chemical Structures of Sulfuric-Acid Lignin. 12. Reaction of Lignin Models with Carbohydrates in 72% H₂SO₄. *Holzforschung* **49** (5), 418-422.
133. Sakakibara, A., 1991. Chemistry of Lignin. *Em: Wood and Cellulosic Chemistry*. Hon, D.N.-S. e Shiraishi, N. (Eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, USA, Cap. 4, p. 113-175.
134. Obolenskaya, A.V.; Elnitskaya, E.P. e Leonovitch, A.A. 1991. *Em: Laboratory Practical Works on Chemistry of Wood and Cellulose (em Russo)*, Ecology, Moscow, p. 107-113, 120-123.
135. Browning, B.L. 1967. The isolation and determination of cellulose. *Em: Methods of Wood Chemistry*, Vol. I, Interscience Publisher, New York, USA, Cap. 19, p. 406.
136. Humphreys, F.R. e Kelly, J. 1961. A Method for the Determination of Starch in Wood. *Anal. Chim. Acta.* **24**, 66-70.
137. Browning, B.L. 1967. The isolation and separation of hemicelluloses. *Em: Methods of Wood Chemistry*, Vol. I, Interscience Publisher, New York, USA, Cap. 26, p. 561-585.
138. Blakeney, A.B., Harris, P.J., Henry, R.J. e Stone, B.A. 1983. A Simple and Rapid Preparation of Alditol Acetates for Monosaccharide Analysis. *Carbohydr. Res.* **113** (2), 291-299.
139. Freire, C.S.R., Silvestre, A.J.D. e Pascoal Neto, C. 2002. Identification of New Hydroxy Fatty Acids and Ferulic Acid Esters in the Wood of *Eucalyptus globulus*. *Holzforschung* **56**, 143-149.
140. Freire, C.S.R., Silvestre, A.J.D. e Pascoal Neto, C. 2002. Lipophilic Extractives of the Inner and Outer Barks of *Eucalyptus globulus*. *Holzforschung* **56**, 372-379.
141. Ekman, R. 1983. Suberin Monomers and Triterpenoids from the outer bark of *Betula verrucosa* Ehrh *Holzforschung* **37**, 205-211.
142. Sharkey, A.G., Friedel, R.A. e Langer, S.H. 1957. Mass Spectra of Trimethylsilyl Derivatives. *Anal. Chem.* **29** (5), 770-776.
143. Draffan, G.H., Stillwell, R.N. e McCloskey, J.A. 1968. Electron Impact-Induced Rearrangement of Trimethylsilyl Groups in Long Chain Compounds. *Org. Mass Spectrom.* **1**, 669-685.

144. Laine, R.A. e Elbein, A.D. 1971. Steryl Glucosides in *Phaseolus aureus*. Use of Gas-Liquid Chromatography and Mass Spectrometry for Structural Identification. *Biochem.* **10** (13), 2547-2553.
145. Morita, H. 1972. Identification of Phenolic Acids by Acids by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *J. Chromatogr.* **71**, 149-153.
146. Rahier, A. e Benveniste, P. 1989. Mass Spectral Identification of Phytosterols. *Em: Analysis of Sterols and Other Biologically Significant Steroids*. Nes, W.D. e Parish, E.J. (Eds.), Academic Press, Inc., Cap.11, p. 223-250.
147. Niemelä, K., 1990. Low-molecular-weight organic compounds in birch kraft black liquor. Ph. D. Thesis, Helsinki University of Technology, Helsinki, Finland.
148. Evershed, R.P. 1992. Mass Spectrometry of Lipids. *Em: Lipids Analysis- A Practical Approach*, Hamilton, R.J. e Hamilton, S. (Eds.), IRL Press, Oxford, p. 263-308.
149. Murphy, R.C. 1993. Handbook of Lipid Research-7 Mass Spectrometry of Lipids. Snyder, F. (Ed.), Plenum Press, New York.
150. Xu, Z. e Godber, J.S. 1999. Purification and Identification of Components of γ -Oryzanol in Rice Bran Oil. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 2724-2728.
151. Graça, J. e Pereira, H. 2000. Suberin Structure in Potato Periderm, Glycerol, Long-Chain Monomers, and Glyceryl and Feruloyl Dimers. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 5476-5483.
152. Serreqi, A.N., Leone, R., Del Rio, L.F., Mei, S., Fernandez, M. e Breuil, C. 2000. Identification and Quantification of Important Steryl Esters in Aspen Wood. *JAOCs* **77** (4), 413-418.
153. Gutiérrez, A. e del Río, J.C., 2001. Gas chromatography/mass spectrometry demonstration of steryl glucosides in eucalypt wood, kraft pulp and process liquids. *Rapid Commun. Mass Spec.* **15**, 2515-2520.
154. Khallouki, F., Younos, C., Soulimani, R., Oster, T., Charrouf, Z., Spiegelhalter, B., Bartsch, H. e Owen, R.W. 2003. Consumption of argan oil (Morocco) with its unique profile of fatty acids, tocopherols, squalene, sterols and phenolic compounds should confer valuable cancer chemopreventive effects. *Euro J. Cancer Prev.* **12**, 67-75.
155. Obst, J.R e Kirk, T.K. 1988. Isolation of Lignin. *Em: Methods in Enzymology*, Vol. 161: Biomass, Part B: Lignin, Pectin and Chitin, Sec. I. Lignin, Wood, W.A. e Kellog, S.T. (Eds.), Academic Press, New York, USA, Cap. 1, p. 3-11.
156. Lundquist, K. 1992. Wood. *Em: Methods in Lignin Chemistry*. Lin, S.Y e Dence, C.W. (Eds.), Springer-Verlag, Berlin, Germany, Cap. 3.1, p. 65-70.
157. Björkman, A. 1956. Studies on Finely Divided Wood. Part I. Extraction of Lignin With Neutral Solvents. *Svensk Papperstid* **59**, 477-485.
158. Monties, B. 1988. Preparation of Dioxane Lignin Fractions by Acidolysis. *Em: Methods in Enzymology*, Vol. 161: Biomass, Part B: Lignin, Pectin and Chitin, Sec. I. Lignin, Wood, W.A. e Kellog, S.T. (Eds.), Academic Press, New York, USA, Cap. 4, p. 31-35.
159. Hirosawa, S., Katahira, R. e Nakatsubo, F. 2002. Chemical Structural elucidation of total lignins in woods I: fractionation of the lignin in residual wood meal after extraction of milled wood lignin. *J. Wood Sci.* **48**, 46-50.
160. Ikeda, T., Holtman, K., Kadla, J.F., Chang, H.M. e Jameel, H. 2002. Studies on effect of ball milling on lignin structure using a modified DFRC method. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 129-135.
161. Pascoal Neto, C., Evtuguin, D. e Paulino, P. 1997. Effect of Polyphenolic Extractives on the Quantification and Structural Characterization of the Lignin of *Eucalyptus globulus*. *Em: 9th Proc. Int. Symp. Wood Pulping Chemistry*, Montréal, Canada, p. 78:1-4.
162. Pepper, J. e Wood, P. 1962. Isolation of a Representative Lignin Fraction from Wood and Straw Meals. *Can. J. Chem.* **40** (5), 1026-&.
163. Mahajan, S. Mandan, R.N. e Nand, J. 1985. Studies on the Chemistry of Lignin of *Eucalyptus globulus*. *J. Indian Pulp & Paper* **17-20**, 32.

164. Dence, C.W. 1992. The Determination of Lignin. *Em: Methods in Lignin Chemistry*. Lin, S.Y e Dence, C.W. (Eds.), Springer-Verlag, Berlin, Germany, Cap. 2.2, p. 33-61.
165. Pascoal Neto, C., Cordeiro, N., Seca, A., Domingues, F., Gandini, A. e Robert, D. 1996. Isolation and Characterization of a Lignin-Like Polymer of the Cork of *Quercus suber* L. *Holzforschung* **50**, 563-568.
166. Girardin, M. e Metche, M. 1983. Microdosage rapid des groupements alkoxydes par chromatographie em phase gazeuse. Application á la lignine. *J. Chromatogr.* **264** (1), 155-158.
167. Meier, D. e Faix, O. 1992. Pyrolysis-Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Em: Methods in Lignin Chemistry*. Lin, S.Y. e Dence, C.W. (Eds.), Springer-Verlag, Berlin, Germany, Cap. 4.7, p. 117-199.
168. Del Río, J.C., Gutiérrez, A. e Martínez, A. 2004. Identifying acetylated lignin units in non-wood fibers using pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **18**, 1181-1185.
169. Gonçalves, A.R., Schuchardt, U., Meier, D. e Faix, O. 1997. Pyrolysis-gas chromatography of the macromolecular fractions of oxidized Organocell lignins. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* **40-41**, 543-551, 1997.
170. Ralph, J. e Hatfield, R.D. 1991. Pyrolysis-GC-MS Characterization of Forage Materials. *J. Agric. Food Chem.* **39**, 1426-1437.
171. Faix, O., Meier, D. e Fortmann, I. 1990. Gas chromatographic separation and mass spectrometric characterization of monomeric lignin derived products. *Holz als Roh und Werkstoff* **48**, 281-285.
172. Faix, O., Meier, D. e Fortmann, I. 1990. Thermal degradation products of wood. A collection of electron-impact (EI) mass spectra of monomeric lignin derived products. *Holz als Roh und Werkstoff* **48**, 351-354.
173. Gutiérrez, A., Rodríguez, I.M. e del Río, J.C. 2004. Chemical Characterization of Lignin and Lipid Fractions in Kenaf Bast Fibers Used for Manufacturing High-Quality Papers. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 4764-4773.
174. Chen, C.-L. 1992. Nitrobenzene and Cupric Oxide Oxidations. *Em: Methods in Lignin Chemistry*. Lin, S.Y e Dence, C.W. (Eds.), Springer-Verlag, Berlin, Germany, Cap. 5, p. 301-321.
175. Chang, H.-M. e Allan, G.G. 1971. Oxidation. *Em: Lignins Occurrence, Formation, Structure and Reactions*. Sarkanen, K.V. e Ludwig, C.H. (Eds.), Wiley-Interscience, New York, USA, Cap. 11, p. 433-485.
176. Tanahashi, M. e Higuchi, T. 1988. Chemical Degradation Methods for Characterization of Lignins. *Em: Methods in Enzymology*, Vol. 161: Biomass, Part B: Lignin, Pectin and Chitin, Sec. I. Lignin, Wood, W.A. e Kellog, S.T. (Eds.), Academic Press, New York, USA, Cap. 13, p. 101-136.
177. Gellerstedt, G. 1992. Chemical Degradation Methods: Permanganate Oxidation. *Em: Methods in Lignin Chemistry*. Lin, S.Y, Dence, C.W. (Eds.), Springer-Verlag, Berlin, Germany, Cap. 6, p. 322-333.
178. Evtuguin, D.V., Domingues, P.N., Amado, F.L. Pascoal Neto, C. e Ferrer Correia, A. 1999. Electrospray ionization mass spectrometry as a tool for lignins molecular weight and structural characterisation. *Holzforschung* **53**, 525-528.
179. Kolodziejski, W., Frye, J.S. e Maciel, G.E. 1982. Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry with Cross Polarization and Magic-Angle Spinning for Analysis of Lodgepole Pine Wood. *Anal. Chem.* **54**, 1419-1424.
180. Himmelsbach, D.S., Barton, F.E., Windham, R. 1983. Comparison of Carbohydrate, Lignin and Protein Ratios between Grass Species by Cross Polarization-Magic Angle Spinning Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance. *J. Agric. Food Chem.* **31**, 401-404.
181. Haw, J.F., Maciel, G.E. e Schroeder, H.A. 1984. Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectrometric Study of Wood and Wood Pulping with Cross Polarization and Magic-Angle Spinning. *Anal. Chem.* **56**, 1323-1329.

182. Maciel, G.E., Haw, J.F., Smith, D.H., Gabrielsen, B.C. e Hatfield, G.R. 1985. Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance of Herbaceous Plants and Their Components, Using Cross Polarization and Magic-Angle Spinning. *J. Agric. Food Chem.* **33**, 185-191.
183. Hatfield, G.R., Maciel, G.E., Erbatur, O. e Erbatur, G. 1987. Qualitative and quantitative analysis of solid lignin samples by Carbon-13-Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Anal. Chem.* **59**, 172-179.
184. Leary, G.J., Morgan, K.R. e Newman, R.H. 1987. Solid state carbon-13 nuclear magnetic resonance study of *Pinus radiata* wood. *Appita* **40** (3), 181-184.
185. Manders, W.F. 1987. Solid-state ^{13}C NMR Determination of the Syringyl/Guaiacyl Ratio in Hardwoods. *Holzforschung* **41**, 13-18.
186. Hawkes, G.E., Smith, C.Z., Utley, J.H.P., Vargas, R.R. e Viertler, H. 1993. A Comparison of Solution and Solid State ^{13}C NMR Spectra of Lignins and Lignin Model Compounds. *Holzforschung* **47**, 302-312.
187. Faix, O. 1992. Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Em: Methods in Lignin Chemistry*. Lin, S.Y e Dence, C.W. (Eds.), Capítulo 4, Springer-Verlag, Berlin, Germany, p. 83-109.
188. Love, G.D., Snape, C.E. e Jarvis, M.C. 1998. Comparison of Leaf and Stem Cell-Wall Components in Barley Straw by Solid-State ^{13}C NMR. *Phytochemistry* **49** (5), 1191-1194.
189. Smits, A.L.M., Ruhnu, F.C., Vliegthart, J.F.G., van Soest, U. e van Soest, J. 1998. Ageing of Starch Based Systems as Observed with FT-IR and Solid State NMR Spectroscopy. *Starch/Stärke* **11-12**, 478-483.
190. Martínez, A.T., Almendros, G., Conzález-Vila, F.J. e Fründ, R. 1999. Solid-state spectroscopic analysis of lignins from several *Austral* hardwoods. *Solid State Nucl. Magn. Reson.* **15**, 41-48.
191. Rodrigues, J., Faix, O. e Pereira, H. 1998. Determination of Lignin Content of *Eucalyptus globulus* Wood Using FTIR Spectroscopy. *Holzforschung* **52**, 46-50.
192. Sun, R.C. e Sun, X.F. 2002. Structural and thermal characterization of acetylated rice, wheat, rye, and barley straws and poplar wood fibre. *Ind. Crops Prod.* **16**, 225-235.
193. Dragunski, D.C. e Pawlicka, A. 2001. Preparation and Characterization of Starch Grafted with Toluene Poly(propylene oxide) Diisocyanate. *Mater. Res.* **4** (2), 77-81.
194. Cordeiro, N., Pascoal Neto, C., Rocha, J., Belgacem, M.N. e Gandini, A. 2002. The Organosolv Fractionation of Cork Components, *Holzforschung* **52** (2), 1-8.
195. Maunu, S.L. 2002. NMR studies of wood and wood products. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **40**, 151-174.
196. Bardet, M., Foray, M.F., Maron, S., Goncalves, P. e Trân, Q.K. 2004. Characterization of wood components of Portuguese medieval dugout canoes with high-resolution solid-state NMR. *Carbohydr. Polym.* **57**, 419-424.
197. Delval, F., Crini, G., Bertini, S., Morin-Crini, N., Badot, P.-M., Vebrel, J. e Torri, G. 2004. Characterization of Crosslinked Starch Materials with Spectroscopic Techniques. *Appl. Polym. Sci.* **93**, 2650-2663.
198. Sun, X.-F., Sun, R.C., Fowler, P. e Baird, M.S. 2005. Extraction and Characterization of Original Lignin and Hemicelluloses from Wheat Straw. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 860-870.
199. Wikberg, H. e Maunu, S.L. 2004. Characterisation of thermally modified hard- and softwoods by ^{13}C CP/MAS NMR. *Carbohydr. Polym.* **58** (4), 1-6.
200. Habibi, Y. e Vignon, M.R. 2005. Isolation and characterization of xylans from seed pericarp of *Argania spinosa* fruit. *Carbohydr. Res.* **340**, 1431-1436.
201. Kacuráková, M., Capek, P., Sasinková, V., Wellner, N. e Ebringerová, A. 2000. FT-IR study of plant cell wall model compounds: pectic polysaccharides and hemicelluloses. *Carbohydr. Polym.* **43** (2), 195-203.

202. Lawther, J.M., Sun, R.C. e Banks, W.B. 1995. Extraction, Fractionation, and Characterization of Structural Polysaccharides from Wheat Straw. *J. Agric. Food Chem.* **43**, 667.
203. Pinto, P.C.O.R. 2005. Influência da estrutura química dos componentes da madeira no seu desempenho nos processos de produção de pastas celulósicas. Estudo comparativo entre *Eucalyptus globulus* e outras folhosas. Tese de Doutorado, Universidade de Aveiro, Aveiro.
204. Ilvessalo-Pfäffli, M.-S. 1995. Fiber Atlas. Identification of Papermaking Fibers, Springer-Verlag, Berlin, Germany, p. 267-388.
205. Obernberger, I., Biederman, F., Widman, W. e Riedl, R. 1997. Concentrations of inorganic elements in biomass fuels and recovery in the different ash fractions. *Biomass and Bioenergy* **12** (3), 211-224.
206. Keitaanniemi, O. e Virkola, N.-E. 1982. Undesirable elements in causticizing systems. *TAPPI* **65** (7), 89-92.
207. Jeyasingam, J.T. 1988. A summary of special problems and considerations related to nonwood pulping world wide. TAPPI Pulping Conference. New Orleans, LA, USA. Vol. III, p.571-579.
208. Xiao, B., Sun, X.F. e Sun, R.C. 2001. Extraction and characterization of lipophilic extractives from rice straw. I. Chemical composition. *J. Wood Chem. Technol.* **21** (4), 397-411.
209. Sun, R.C. e Sun, X.F. 2001. Identification and quantitation of lipophilic extractives from wheat straw. *Ind. Crops Prod.* **14**, 51-64.
210. Sun, R.C. e Tomkinson, J. 2001. Extraction and characterization of lipophilic extractives from wheat straw. I. Chemical Composition. *Cellul. Chem. Technol.* **35** (5-6), 471-485.
211. Sun, R.C. e Sun, X.F. 2001. Separation and characterization of lipophilic extracts from barley straw. *Sep. Sci. Technol.* **36** (13), 3027-3048.
212. Sun, J.-X., Sun, X.-F., Sun, R.-C., Fowler, P. e Baird, M. S. 2003. Inhomogeneities in the chemical structure of sugarcane bagasse lignin. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 6719-6725.
213. Knapp, F.F., Phillips, D.O., Goad, L.J. e Goodwin, T.W. 1972. Isolation of 14 α -methyl-9 β ,19-cyclo-5 α -ergost-24(28)-en-3 β -ol from *Musa sapientum*. *Phytochemistry* **11**, 3497-3500.
214. Sitholé, B.B. 1992. Modern Methods for the Analysis of Extractives from Wood and Pulp: a Review. *Appita* **45** (4), 260-264.
215. Holmbom, B. 1999. Extractives. *Em: Analytical Methods in Wood Chemistry, Pulping and Papermaking*. Sjöström, E. e Alén, R. (Eds.), Springer-Verlag, Berlin, Germany, Cap. 5, p. 125-148.
216. Freire, C.S.R., Silvestre, A.J.D. e Pascoal Neto, C. 2003. Oxidized Derivatives of Lipophilic Extractives Formed during Hardwood Kraft Pulp Bleaching. *Holzforschung* **57**, 503-512.
217. Smith, Jr. C.R. e Wolff, I.A. 1969. Characterization of naturally occurring α -hydroxylinoleic acid. *Lipids* **4**, 9-14.
218. Imai, H., Yamamoto, K., Shibahara, A., Miyatani, S. e Nakayama, T., 2000. Determining double-bond positions in monoenoic 2-hydroxyfatty acids of glucosylceramides by gas chromatography-mass spectrometry. *Lipids* **35**, 233-236.
219. Brooks, C.J.W. 1979. Some Aspects of Mass Spectrometry in Research on Steroids. *Philos. Trans. R. Soc. London, Ser. A* **293**, 53-67.
220. Marques, A.V., Pereira, H., Meier, D. e Faix, O. 1999. Structural Characterization of Cork Lignin by Thioacidolysis and Permanganate Oxidation. *Holzforschung* **53** (2), 167-174.
221. Grunwald, C. e Huang, L.-S. 1989. Analysis of sterylglucosides. *Em: Nes, W.D., e Parish, E.J. (Eds.), Analysis of sterols and other biologically significant steroids*. Academic Press, Inc., San Diego, p. 49-60.
222. Moreau, R., Whitaker, B.D. e Hicks, K.B. 2002. Phytosterols, phytostanols and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis and health promoting uses. *Prog. Lipid Res.* **14**, 457-500.

223. Quílez, J., Garcia-Lorda, P. e Salas-Salvadó, J. 2003. Potential uses and benefits of phytosterols in diet: present situation and future directions. *Clin. Nutr.* **22**, 343-351.
224. Banskota, A.H., Tesuka, Y., Adnyana, I.K., Xiong, Q.B., Hase, K., Tran, K.Q., Tanaka, K., Saiki, I. e Kadota, S. 2000. Hepatoprotective effect of *Combretum quadrangulare* and its constituents. *Biol. Pharm. Bull.* **23**, 456-60.
225. Bouic, P.J.D., Clark, A., Lamprecht, J., Freestone, M., Pool, E.J., Liebenberg, R.W., Kotze, D. e Van Jaarsveld, P.P. 1999. The effects of β -sitosterol (BSS) and β -sitosterol glucoside (SSG) mixture on selected immune parameters of maraton runners: Inhibition of post maraton immune supression and inflammation. *Int. J. Sport Med.* **20**, 258-262.
226. Delporte, C, Backhouse, N, Negrete, R, Salinas, P, Rivas, P, Cassels, BK e San Feliciano, A. 1998. Antipyretic, hypothermic and anti-inflammatory activities and metabolites from *Solanum ligustrinum* Lood. *Phytother. Res.* **12**, 118-122.
227. Kiriakidis, S., Stathi, S., Jha, H.C., Hartmann, R. e Egge, H. 1997. Fatty acid esters of sitosterol 3-beta-glucoside from soybeans and tempe (fermented soybeans) as anti-proliferative substances. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **22**, 139-147.
228. Park, K.Y., Jung, K.O., Rhee, S.H. e Choi, Y.H., 2003. Antimutagenic effects of doenjang (Korean fermented soypaste) and its active compounds. *Mutat. Res.-Fund. Mol. M.* **523**, 43-53.
229. Ralph, J. e Helm, R.F., 1993. Lignin/hydroxycinnamic acid/ polysaccharide complexes, synthetic models for regiochemical characterization. *Em: Forage Cell Wall Structure and Digestability*. Jung, H.G., Buxton, D.R., Hatfield, R.D. e Ralph (Eds.), J. Am. Soc. of Agronomy, Madison, p. 201-246.
230. Nair, G.V. e von Rudloff, E. 1959. The chemical composition of the heartwood extractives of tamarack (*Larix laricina* (du Roi) K. Koch). *Can. J. Chem.* **37**, 1608-1613.
231. Kolattukudy, P.E. e Espelie, K.E. 1989. Chemistry, biochemistry and function of suberin and associated waxes. *Em: Natural Products of Woody Plants*. Rowe, J.W (Ed.), Springer-Verlag, Berlin. p. 304-349.
232. Chen, C.-L. 1970. Constituents of *Quercus alba*. *Phytochemistry* **9**, 1149.
233. Ekman, R. e Holmbom, B. 1989. Analysis by gas chromatography of the wood extractives in pulp and water samples from mechanical pulping of spruce. *Nord. Pulp Paper Res. J.* **1**, 16-24.
234. Suckling, I.D. e Ede, R.M. 1990. A Quantitative ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance Method for the Analysis of Wood Extractives and Pitch Samples. *Appita* **43** (1), 77-80.
235. Barros, C.S.R.F. 2003. Compostos orgânicos de baixo peso molecular de *Eucalyptus globulus*: comportamento durante o cozimento kraft da madeira e branqueamento da pasta celulósica. Tese de Doutorado, Universidade de Aveiro, Aveiro.
236. Teleman, A., Nordstrom, M., Tenkanen, M., Jacobs, A. e Dahlman, O. 2003. Isolation and characterization of *O*-acetylated glucomannans from Aspen and Birch wood. *Carbohydr. Res.* **338** (6), 525-534.
237. Lisboa, S.A., Evtuguin, D.V., Pascoal Neto, C. e Goodfellow, B.J. 2005. Isolation and structural characterization of polysaccharides dissolved in *Eucalyptus globulus* kraft black liquors. *Carbohydr. Polym.* **60**, 77-85.
238. Evtuguin, D.V., Tomás, J.L., Silva, A.M.S., Pascoal Neto, C. 2003. Characterization of an acetylated heteroxylan from *Eucalyptus globulus* Labill. *Carbohydr. Res.* **338**, 597-604.
239. Teleman, A., Harjunpaa, V., Tenkanen, M., Buchert, J., Hausalo, T., Drakenberg, T. e Vuorinen T. 1995. Characterization of 4-Deoxy-Beta-L-Threo-Hex-4-Enopyranosyluronic Acid attached to Xylan in Pine Kraft Pulp and Pulping Liquor by H-1 and C-13 NMR-Spectroscopy. *Carbohydr. Res.* **272** (1), 55-71.
240. van Hazendonk, J. M., Reinerink, E. J. M., de Waard, P. e van Dam, J. E. G. 1996. Structural analysis of acetylated hemicellulose polysaccharides from fibre flax (*Linum usitatissimum* L.). *Carbohydr. Res.* **291**, 141-154.

241. Teleman, A., Kruus, K., Ammalahti, E., Buchert, J. e Nurmi, K. 1999. Structure of dicarboxyl malto-oligomers isolated from hypochlorite-oxidised potato starch studied by H-1 and C-13 NMR spectroscopy. *Carbohydr. Res.* **315** (3-4), 286-292.
242. Teleman, A., Lundqvist, J., Tjerneld, F., Stalbrand, H. e Dahlman, H. 2000. Characterization of Acetylated 4-O-methylglucuronoxylan isolated from Aspen employing ¹H and ¹³C NMR Spectroscopy. *Carbohydr. Res.* **329** (4), 807-815.
243. Mondal, S.K., Ray, B., Ghosal, P.K., Teleman, A. e Vuorinen, T. 2001. Structural features of a water soluble gum polysaccharide from *Murraya paniculata* fruits. *Int. J. Biol. Macromol.* **29**, 169-174.
244. Lundqvist, J., Teleman, A., Junel, L., Zacchi, G., Dahlman, O., Tjerneld, F. e Stalbrand, H. 2002. Isolation and characterization of galactoglucomannan from spruce (*Picea abies*). *Carbohydr. Polym.* **48**, 29-39.
245. Gonzaga, M.L.C., Ricardo, N.M.P.S., Heatley, F. e Soares, S.A. 2005. Isolation and characterization of polysaccharides from *Agaricus blazei* Murill. *Carbohydr. Polym.* **60**, 1, 43-49.
246. Kardosová, A., Matulová, M. e Malovíková, A. 1998. (4-O-Methyl- α -D-glucurono)-D-xylan from *Rudbeckia fulgida*, var. *sullivantii* (Boynton et BeaLDe). *Carbohydr. Res.* **308**, 99-105.
247. Vignon, M.R. e Gey, C. 1998. Isolation, ¹H and ¹³C NMR studies of (4-O-methyl-D-glucurono)-D-xylans from luffa fruit fibres, jute bast fibres and mucilage of quince tree seeds. *Carbohydr. Res.* **307**, 107-111.
248. Shatalov, A.A., Evtuguin, D.V. e Pascoal Neto, C. 1999. (2-O- α -D-Galactopyranosyl-4-O-methyl- α -D-glucurono)-D-xylan from *Eucalyptus globulus* Labill. *Carbohydr. Res.* **320**, 93-99.
249. Yang, B.Y., Ding, Q. e Montgomery, R. 2002. Extracellular polysaccharides of a bacterium associated with a fungal canker disease of *Eucalyptus* sp. *Carbohydr. Res.* **337**, 731-742.
250. York, W.S., Kolli, V.S.K., Orlando, R., Albersheim, P. e Darvill, A.G. 1996. The structures of arabinoxyloglucans produced by solanaceous plants. *Carbohydr. Res.* **285**, 99- 128.
251. Sun, J.X., Sun, X.F., Sun, R.C. e Su, Y.Q. 2004. Fractional extraction and structural characterization of sugarcane bagasse hemicelluloses. *Carbohydr. Polym.* **56**, 195-204.
252. Sun, R.C., Lawther, J.M., Banks, W.B. e Xiao, B. 1997. Effect of extraction procedure on the molecular weight of wheat straw lignins. *Ind. Crops Prod.* **6** (2), 97-106.
253. Quesada, J., Rubio, M. e Gomez, D. 1997. Chemical Characterization of Ozonated Lignin Solutions From Corn (*Zea Mays*) Stalk and Poplar (*Populus Deltoides*) Wood By Capillary Gas Chromatography. *HRC J. High Resolut. Chromatogr.* **20** (10), 565-568.
254. Quesada, J., Rubio, M. e Gomez, D. 1998. Lignin organosolvlysis from autohydrolyzed corn (*Zea mays*) stalks: Ozonation of both solvolytic solid and juice. *J. Appl. Polym. Sci.* **68** (11), 1867-1876.
255. Pan, G.X., Spencer, L. e Leary, G.J. 2000. A comparative study on reactions of hydrogen peroxide and peracetic acid with lignin chromophores - Part 1. The reaction of coniferaldehyde model compounds. *Holzforschung* **54** (2), 144-152.
256. Pan, G.X., Spencer, L. e Leary, G.J. 2000. A comparative study on reactions of hydrogen peroxide and peracetic acid with lignin chromophores - part 2. The reaction of stilbene-type model compounds. *Holzforschung* **54** (2), 153-158.
257. Chen, C.-L. e Robert, D. 1988. Characterization of Lignin by ¹H and ¹³C NMR Spectroscopy. *Em: Methods in Enzymology*, Vol. 161. Biomass. Part B. Lignin, Pectin and Chitin. Sec. I. Lignin. Wood, W. e Kellog, S. (Eds.), Academic Press, New York, Cap. 15, p. 137-158.
258. Nimz, H.H. 1974. Beech Lignin – Proposal of a Constitutional Scheme. *Angew. Chem., Int. ed. Engl.* **13**, 313-321.
259. Sudo, K. e Pepper, J.M. 1982. Lignin and Related Compounds. IX. The Isolation of a Dimer with a Benzylochroman Structure from the Hydrogenolysis Products of Aspen Lignin. *Can. J. Chem.* **60** (2), 229-230.

260. Lai, Y.-Z. e Guo, X.-P. 1991. Variation of the Phenolic Hydroxyl Group Content in Wood Lignins. *J. Wood Chem. Technol.* **25**, 467-472.
261. Lai, Y.-Z. e Funaoka, M. 1993. The Distribution of Phenolic Hydroxyl Groups in Hardwood Lignins. *J. Wood Chem. Technol.* **13**, 43-45.
262. Seca, A.M.L., Cavaleiro, J.A.S., Domingues, F.M.J., Silvestre, A.J.D., Evtuguin, D. e Pascoal Neto, C. 1998. Structural Characterization of the Bark and Core Lignins from Kenaf (*Hibiscus cannabinus*). *J. Agric. Food Chem.* **46**, 3100-3108.
263. Seca, A.M.L., Cavaleiro, J.A.S., Domingues, F.M.J., Silvestre, A.J.D., Evtuguin, D. e Pascoal Neto, C. 2000. Structural Characterization of the Lignin from the Nodes and Internodes of *Arundo donax* Reed. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 817-824.
264. Xie, Y. e Terashima, N. 1991. Selective Carbon 13-Enrichment of Side Chain Carbons of *Ginkgo* Lignin Traced by Carbon 13 Nuclear Magnetic Resonance. *Mokuzai Gakkaishi* **37** (10), 935-941.
265. Marques, A.V., Pereira, H., Meier, D. e Faix, O. 1996. Isolation and characterization of a guaiacyl lignin from saponified cork of *Quercus suber* L. *Holzforschung* **50** (5), 393-400.
266. Choi, J.-W., Faix, O. e Meier, D. 2001. Characterization of Residual Lignins from Chemical Pulps of Spruce (*Picea abies* L.) and Beech (*Fagus sylvatica* L.) by Analytical Pyrolysis-Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *Holzforschung* **55**, 185-192.
267. Evtuguin, D.V., Pascoal Neto, C., Silva, A.M.S., Domingues, P.M., Amado, F.M.L., Robert, D. e Faix, O. 2001. Comprehensive Study on the Chemical Structure of Dioxane Lignin from Plantation *Eucalyptus globulus* Wood. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 4252-4261.
268. Faix, O. 1991. Classification of lignins from different botanical origins by FT-IR spectroscopy. *Holzforschung* **45** (Suppl.), 21-27.
269. Herbert, H.L. 1971. Infrared Spectra. *Em: Lignins. Occurrence, formation, structure and reactions.* Sarkanen, K. V. e Ludwig, C. H. (Eds.), Wiley-Interscience, New York, p. 267-297.
270. Sarkanen, K.V., Chang, H.-M. e Allan, G.G. 1967. Species variation in lignins. 2. Conifer lignins. *Tappi J.* **50**, 583-586.
271. Kolattukudy, P.E. 1980. Biopolyester membranes of plants: cutin and suberin. *Science* **208**, 990-1000.
272. Herbert, H.L. 1971. Infrared Spectra. *Em: Lignins. Occurrence, formation, structure and reactions.* Sarkanen, K.V. e Ludwig, C.H. (Eds.), Wiley-Interscience: New York, pp 267-297.
273. Vázquez, G., Antorrena, G., González, J. e Freire, S. 1997. FTIR, ¹H and ¹³C NMR Characterization of Acetosolv-Solubilized Pine and *Eucalyptus* Lignins. *Holzforschung* **51** (2), 158-166.
274. Hortling, B., Tamminen, T. e Kenttä, E. 1997. Determination of Carboxyl and Non-Conjugated Carbonyl Groups in Dissolved and Residual Lignins by IR Spectroscopy. *Holzforschung* **51**, 405-410.
275. Faix, O., Argyropoulos, D.S., Robert, D. e Neirinck, V. 1994. Determination of Hydroxyl Groups in Lignins Evaluation of ¹H NMR, ¹³C NMR, ³¹P NMR, FTIR and Wet Chemical Methods. *Holzforschung* **48**(5), 387-394.
276. Ludwig, C.H. 1971. Magnetic Resonance Spectra. *Em: Lignins-Occurrence, Formation, Structure and Reactions,* Sarkanen, K.V. e Ludwig, C.H. (Eds.), Wiley-Interscience, New York, 299-344.
277. Robert, D. 1992. Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry. *Em: Methods in Lignin Chemistry.* Lin, S.Y. e Dence, C.W. (Eds.), Springer Verlag, Berlin, p. 250-273.
278. Lapierre, C. 1993. Application of new methods for the investigation of lignin structure. *Em: Forage Cell Wall Structure and Digestibility.* Jung, G.H., Buxton, D.R., Hatfield, R.D. e Ralph, J., (Eds.), ASA-CSSA-SSSA: Madison, WI, p.133-166.
279. Nimz, H.H., Robert, D., Faix, O. e Nemr, M. 1981. ¹³C NMR Spectra of Lignins. 8. Structural Differences between Lignins of Hardwoods, Softwoods, Grasses and Compression Wood. *Holzforschung* **35**(1), 16-26.

- 280. Ralph, S.A., Ralph, J. e Landucci, L.L. NMR Database of Lignin and Cell Wall Model Compounds. 1996; available at URL <http://www.dfrc.wisc.edu/software.html> (accessed 17.01.2004).
- 281. Kilpeläinen, I., Sipilä, J., Brunow, G., Lundquist, K. e Ede, R.M. 1994. Application of Two-dimensional NMR Spectroscopy to Wood Lignin Structure Determination and Identification of Some Minor Structural Units of Hard- and Softwood Lignins. *J. Agric. Food Chem.* **42** (2), 2790-2794.
- 282. Ede, R.M. e Kilpeläinen, I. 1995. Homo-and Hetero-nuclear 2D NMR Techniques: Unambiguous Structural Probes for Noncyclic Benzyl Aryl Ethers in Soluble Lignin Samples. *Res. Chem. Intermed.* **21**, 313-328.
- 283. Capanema, E.A., Balakshin, M.Yu. e Kadla, J.F. 2004. A comprehensive approach for quantitative lignin characterization by NMR spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 1850-1860.
- 284. Lundquist, K. 1992. Proton (^1H) NMR Spectroscopy. *Em: Methods in Lignin Chemistry*. Lin, S.Y. e Dence, C.W. (Eds.), Springer Verlag, Berlin, p. 242-247.